

Manecas Francisco Baloi

Manejo alimentar de juvenis de sardinha-verdadeira *Sardinella
brasiliensis* (Steindachner, 1879)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Baloi, Manecas Francisco

Manejo alimentar de juvenis de sardinha-verdadeira
Sardinella brasiliensis (Steindachner 1879) / Manecas
Francisco Baloi ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira
- Florianópolis, SC, 2017.

111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. piscicultura marinha. 3. sardinha
verdadeira. 4. frequência alimentar. 5. taxa de
alimentação. I. Cerqueira, Vinicius Ronzani . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Manejo alimentar de juvenis de sardinha-verdadeira *Sardinella
brasiliensis* (Steindachner 1879)**

Por

MANECAS FRANCISCO BALOI

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOCTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

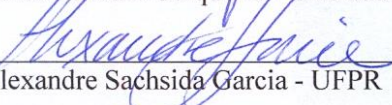


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



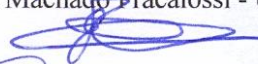
Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira - Orientador



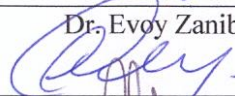
Dr. Alexandre Sachsis Garcia - UFPR




Dra. Debora Machado Fracalossi - UFSC



Dr. Evoy Zaniboni Filho



Dr. Gilberto Caetano Manzoni - UNIVALI



Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC

Dedico este trabalho a todos os meus professores, do ensino básico (primário) até a pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo e sincero agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho:

Ao Prof. Vinícius Cerqueira pela oportunidade oferecida, orientação, apoio e confiança;

A Carlito e todos os professores do Programa de Pós de Graduação em Aquicultura não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender;

A TWAS-CNPq Postgraduate Fellowship Programme pela bolsa de estudo;

A minha mãe pelo amor, incentivo e apoio incondicional;

Aos meus irmãos que nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente;

A Carla e aos “pinguins” Rafael & Ricardo que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que chegasse até esta etapa de minha vida;

Ao Prof. Antônio Hoguane e todo staff da ESCMC-UEM pela oportunidade oferecida;

A toda equipe do LAPMAR pelas alegrias compartilhadas nesses quatro anos: Israel, Marco Owatari, Cristina, Gabriel, Fábio, Tim, Pedro, Caio, Fabíola, Patrícia, Fernanda, Jaqueline, Brunno, Bruna, Jorgélia, Larissa, Ewerton, Lucas, João Henrique, Virgínia, Sasá e Murilo;

A comunidade MozFloripa um profundo “*khanimambo*” por tudo de bom que juntos passamos;

Aos meus amigos da Pérola do Índico pelo constante apoio e incentivo: Geslen, Stélio, Felício, Jorge, Abdul, Tininha, Wambena, Pedro, Salmo, Zito, Mariza, Érica, Hélio e Lucas Lavo.

“Aquaculture, not the Internet, represents the most promising investment opportunity of the 21st Century”

Peter Drucker

Pai da Administração Moderna (19/11/1909-11/11/2005)

“Tudo está na mente. É onde tudo começa. Saber o que você quer é o primeiro passo na direção de conseguir”.

Mae West

Atriz (17/08/1893-20/11/1980)

RESUMO

A sardinha-verdadeira é o principal recurso pesqueiro do Brasil que sustenta diretamente a indústria de enlatados, como matéria prima, e indiretamente a pesca de tunídeos, pois os juvenis são utilizados como isca-viva na captura de atuns. Foram realizados dois experimentos com a finalidade de determinar a frequência e taxa de alimentação ideais para juvenis de sardinha-verdadeira. A frequência alimentar ideal para juvenis com peso inicial de $3,27 \pm 0,56$ g, foi definida como sendo a de duas vezes por dia, após um experimento de 50 dias com a utilização de seis frequências alimentares (um a seis vezes por dia). A sobrevivência foi de 100% em todos os tratamentos. Os peixes alimentados duas vezes por dia apresentaram menor consumo de ração e maior eficiência alimentar quando comparado com os alimentados de três a seis vezes por dia. Houve aumento do teor de lipídios com o aumento da frequência alimentar, enquanto que a umidade mostrou tendência oposta. No segundo experimento, os peixes ($1,69 \pm 0,26$ g) foram alimentados com seis taxas de alimentação: 2%, 4%, 6%, 8%, 10% do peso vivo por dia (PV dia⁻¹) e saciedade. A sobrevivência dos peixes alimentados de 2 a 6% PVdia⁻¹ foi maior em relação aos outros tratamentos. Houve aumento do ganho em peso e taxa de crescimento específico com o aumento da taxa de alimentação, enquanto que a utilização de nutrientes diminuiu. A concentração dos níveis plasmáticos de proteínas totais, colesterol e triglicerídeos aumentou com o aumento da frequência alimentar; porém a glicose manteve-se inalterada. A atividade enzimática das proteases e da amilase, diminuiu com o aumento da taxa de alimentação, porém não houve influência sobre a atividade da lipase. Em baixas taxas de alimentação ocorre a mobilização dos metabólitos plasmáticos para a produção de energia e as atividades das enzimas digestivas aumentam de modo a melhorar a utilização dos nutrientes. A taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira foi de 5,45 % PVdia⁻¹. Considerando a sardinha-verdadeira como uma nova espécie aquícola, os resultados obtidos nesse estudo servem de subsídio para o estabelecimento de um protocolo alimentar para esta espécie.

Palavras-chave: Aquicultura, piscicultura marinha, sardinha-verdadeira, frequência alimentar, taxa de alimentação.

ABSTRACT

Brazilian sardine is the main fishing resource in Brazil, which holds directly the canning industry, as raw material, and indirectly the tuna fishing, because juveniles are used as live bait. Two experiments were carried out to determine the optimal feeding frequency and feeding rate for juvenile's Brazilian sardine. The optimum feeding frequency for juveniles with initial body weight 3.27 ± 0.56 g was defined as being twice a day after a 50-day experiment using six food frequencies (one to six times a day). Survival was 100% in all treatments. Fish fed twice daily had lower feed intake and higher feed efficiency when compared to those fed three to six times daily. Whole-body lipid content increased significantly as the feeding frequency increased, while moisture content showed an opposite trend. In the second trial juvenile Brazilian sardine (1.69 ± 0.26 g) were fed at six feeding rates, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% body weight per day (BWday^{-1}) and satiation. The survival of fish fed at 2 to 6 % BWday^{-1} was significantly higher than at the other feeding rates. The final body weight and specific growth rate significantly increased with increasing feeding rates while, feed utilization decreased. Total proteins, cholesterol and triglycerides concentrations increased significantly with increasing feeding rates; however, there was no effect on glucose levels. Proteases and amylase activities significantly decreased with increasing feeding rates, while, the lipase activity was not influenced by the feeding rate. Results suggest that low feeding rates stimulate mobilization of metabolites to supply energy for the maintenance of overall metabolism and digestive enzymes activities increase to enhance feed utilization. The optimum feeding rate of juvenile Brazilian sardine was 5.45 % BWday^{-1} . Considering the Brazilian sardine as a new aquaculture species, the results obtained in this study serve as a subsidy for the establishment of a food protocol for this species.

Keywords: Aquaculture, marine fish farming; Brazilian sardine, feeding frequency, feeding rate

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de alimentação ideal para várias espécies de peixes cultivadas.....	32
Tabela 2. Protocolo alimentar de juvenis de sardinha-verdadeira durante o período experimental	42
Tabela 3. Parâmetros de crescimento de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média \pm desvio padrão de três réplicas	45
Tabela 4. Valores médios obtidos para IHS e IGM de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média \pm desvio padrão de três réplicas.	46
Tabela 5. Composição centesimal inicial e final de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média \pm desvio padrão de três réplicas.	47
Tabela 6. Parâmetros zootécnicos de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação	64
Tabela 7. Ingestão alimentar diária e utilização de nutrientes em juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação.....	66
Tabela 8. Composição centesimal de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação	67
Tabela 9. Metabólitos plasmáticos de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da Sardinha-verdadeira. Fonte: Cergole; Dias-Neto (2011)	23
Figura 2. Sardinha-verdadeira, <i>Sardinella brasiliensis</i>	24
Figura 3. Ciclo de vida da Sardinha-verdadeira. Adaptado de Martí (2012).	25
Figura 4. Consumo médio de ração por cada tratamento durante cada horário de alimentação em juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias	46
Figura 5. Taxa de alimentação ideal de juvenis de Sardinha-verdadeira baseado na TRP determinada através da regressão polinomial de segunda ordem.	65
Figura 6. Atividade específicas da protease ácida (A), protease alcalina (B), amilase (C) e lipase (D) de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação. Dados são mostrados como média \pm DP (n = 6). Barras com letras com diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).	68
Figura 7. Indução hormonal da sardinha-verdadeira	105
Figura 8. Juvenis de sardinha-verdadeira	105
Figura 9. Exemplares de sardinha-verdadeira	106
Figura 10. Sala experimental com sistema de recirculação	107
Figura 11. Sala experimental	107
Figura 12. Sinfonagem dos tanques	108
Figura 13. Alimentação dos peixes	108

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1. Panorama Mundial da Aquicultura e da Piscicultura Marinha	21
1.2. Aspectos Biológicos da Sardinha-verdadeira, <i>Sardinella brasiliensis</i>	22
1.3. Isca-Viva.....	26
2. MANEJO ALIMENTAR	27
2.1. Frequência Alimentar	28
2.2. Taxa de Alimentação.....	30
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1. Geral.....	34
4.2. Específicos	34
5. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS	35
CAPÍTULO I.....	37
Efeito da frequência alimentar no crescimento, eficiência alimentar e composição corporal em juvenis de sardinha-verdadeira, <i>Sardinella brasiliensis</i> (Steindachner 1879)	37
Resumo	38
Abstract	38
1. Introdução.....	39
2. Materiais e Métodos	41
2.1. Material biológico	41
2.2. Procedimentos experimentais	41
2.3. Composição centesimal	43
2.4. Estatística.....	43
3. Resultados.....	43
3.1. Parâmetros de crescimento e consumo de ração.....	43
3.2. Índices hepato-somático e de gordura mesentérica	44
3.3. Composição centesimal	47
4. Discussão	47
5. Conclusão	50
Agradecimentos	50
CAPÍTULO II.....	55
Crescimento, composição centesimal e respostas metabólicas a diferentes taxas de alimentação em juvenis de sardinha-verdadeira <i>Sardinella brasiliensis</i> (Steindachner 1879)	55
Resumo	56
Abstract	56

1. Introdução.....	57
2. Materiais e Métodos	59
2.1. Procedimentos experimentais	59
2.2. Composição centesimal	60
2.3. Metabólitos plasmáticos	61
2.4. Atividade enzimática.....	61
2.5. Estatística	63
3. Resultados.....	63
3.1. Parâmetros zootécnicos e utilização dos nutrientes	63
3.2. Composição centesimal	64
3.3. Metabólitos plasmáticos	64
3.4. Atividade enzimática.....	65
4. Discussão.....	69
Agradecimentos	73
Referências.....	74
CONCLUSÕES GERAIS	81
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	83
ANEXO I	93
PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	93
ANEXO II	105
APÊNDICE	109

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Panorama Mundial da Aquicultura e da Piscicultura Marinha

A aquicultura continua a ser importante fonte de alimento, nutrição, renda e subsistência para centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. Com a produção pesqueira relativamente estável desde o final de 1980, a aquicultura é responsável pelo impressionante crescimento no fornecimento de pescado para o consumo humano. A aquicultura apresenta-se como uma das atividades do ramo de produção animal que mais cresce no mundo, com uma taxa média de crescimento de 5,8% entre 2005-2014. De acordo com as últimas estatísticas recolhidas globalmente pela FAO, a produção aquícola mundial atingiu outro recorde histórico de 101,1 milhões t em 2014, gerando um valor de US\$165,8 bilhões, incluindo a produção de plantas aquáticas, sendo que 88,91% dessa produção provém do Continente Asiático (FAO, 2016).

O aumento na produção de organismos aquáticos se deve, dentre diversos fatores, ao crescimento da população mundial e consequente aumento do consumo mundial de pescado *per capita*, e ao desenvolvimento de tecnologias de cultivo, que possibilitam intensificar os sistemas de produção. O abastecimento mundial de pescado per capita atingiu um novo recorde de 20 kg em 2014, graças ao crescimento vigoroso na aquicultura, que agora fornece metade da produção mundial para consumo humano (FAO, 2016).

Atualmente, 580 espécies são cultivadas em cerca de 190 países em várias instalações e sistemas de cultivo, e sofisticação tecnológica, utilizando água doce, salobra e marinha (FAO, 2016). Para muitas espécies aquáticas cultivadas, as tecnologias de produção de ovos e larvas foram desenvolvidas e estabelecidas. Para algumas espécies, principalmente peixes marinhos, o cultivo ainda depende inteiramente de “sementes” selvagens.

Entre os principais produtores, os principais grupos de espécies cultivadas e sistemas de cultivo variam muito. Países como a Índia, Bangladesh, Egito, Myanmar e Brasil dependem fortemente da piscicultura continental, enquanto o seu potencial para a produção de peixes marinhos permanece largamente inexplorado (FAO, 2014).

Ao redor do mundo a piscicultura marinha é um segmento da aquicultura em plena evolução, com alguns países e regiões já se destacando em produção e tecnologia. Em 2012, segundo a FAO, a

produção mundial foi de 5,6 milhões de toneladas, equivalente a 12,6% da produção mundial de peixes marinhos. Embora ainda pouco representativa em termos volumétricos, a criação de peixes marinhos já participa com 26,9% do valor monetário total gerado pelo cultivo mundial de peixes.

Isso ocorre porque o cultivo de peixes marinhos inclui uma grande proporção de espécies carnívoras, com elevado valor no mercado em relação aos peixes de água doce. Não é surpresa que esta atividade cresça a taxas aceleradas, superiores a 17% ao ano.

Nos últimos anos, o sudeste asiático, a costa do Mediterrâneo, os Estados Unidos e a Austrália vêm se destacando no cultivo de espécies como o pargo japonês (*Pagrus major*), o pargo europeu (*Sparus aurata*), as tainhas (*Mugil platanus* e *M. cephalus*), o linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), o linguado europeu (*Psetta maxima*), o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), os olhetes (*Seriola* sp.), as garoupas, (*Epinephelus* sp.), o robalo Asiático (*Lates calcarifer*) e ainda no cultivo de espécies diádromas como o salmão do Atlântico, *Salmo salar* (Noruega e Chile), o salmão do Pacífico, *Oncorhynchus* sp. (Japão e Chile), o peixe-leite, *Chanos chanos* (Filipinas e Indonésia).

Apesar do crescimento acelerado, a piscicultura marinha ainda enfrenta gargalos como a captura de reprodutores, a falta de tecnologia apropriada para a propagação artificial, de modo a promover a oferta de alevinos e ao mesmo tempo desenvolver técnicas de cultivo intensivas, além da dependência da farinha e do óleo de peixe, subprodutos da pesca que são as principais fontes de proteína e ácidos graxos essenciais na alimentação dos peixes cultivados. Portanto, como a produção mundial de farinha e óleo de peixe encontra-se no limite máximo, o futuro do cultivo de peixes marinhos, dependerá da substituição desses ingredientes (CAVALLI; FERREIRA, 2010).

1.2. Aspectos Biológicos da Sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*

As sardinhas pertencem a um grupo de peixes pelágicos subtropicais de hábitos costeiros classificados em três gêneros e cerca de 18 espécies largamente distribuídas ao redor do mundo, embora sejam fundamentalmente espécies de águas quentes, cuja distribuição mundial é restrita dentro das latitudes 60°N e 50°S (SCHWEIGERT, 2002).

O gênero *Sardinella* é largamente distribuído ao redor do mundo, ocupando os dois lados do Oceano Atlântico e também do Indo-Pacífico. A espécie sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*

(Steindachner 1879) está geograficamente isolada dos demais grupos do gênero *Sardinella* no Oceano Atlântico (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). Na costa brasileira, é encontrada ao longo da área compreendida entre os Estados de Rio de Janeiro (Cabo de São Tomé) e de Santa Catarina, (ao sul do Cabo de Santa Marta) (Figura 1), entre profundidades que variam de 30 a 100 m, (CERGOLE, 1995; JABLONSKI, 2007). Os indivíduos menores ocorrem em região estuarino-lagunar e os adultos na plataforma continental (SACCARDO; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 1991).

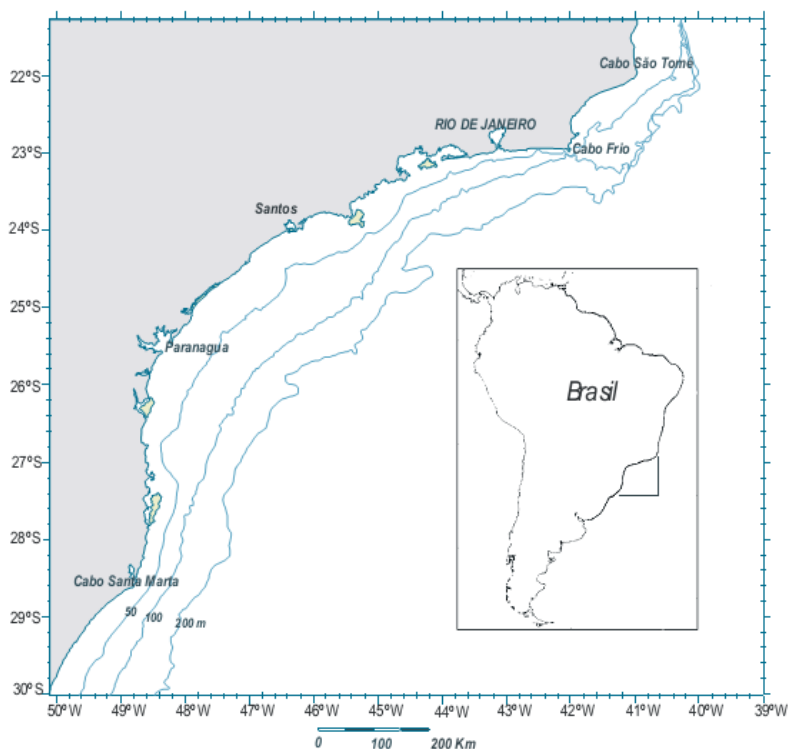


Figura 1. Distribuição da Sardinha-verdadeira. Fonte: Cergole; Dias-Neto (2011)

A sardinha-verdadeira tem como posição sistemática Classe: Teleostomi; Subclasse Actinopterygii; Infraclasse: Neopterygii; Divisão: Teleostei; Coorte: Clupeocephala; Superordem: Clupeomorpha; Ordem: Clupeiformes; Subordem: Clupeoidei; Família: Clupeidae; Subfamília:

Clupeinae; Gênero: *Sardinella*; Espécie: *Sardinella brasiliensis* (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

A sardinha-verdadeira pertence a um grupo de peixes onívoros de pequeno porte, de corpo lateralmente comprimido e prateado (Figura 2); forma cardumes com pequena amplitude de comprimento (agregação por tamanho), habitando águas costeiras e entram em baías e estuários (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). A espécie apresenta ciclo de vida curto com uma longevidade que não ultrapassa os quatro anos, crescimento rápido, alta taxa de fecundidade e indivíduos com tamanho máximo de 270 mm (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011; CERGOLE; VALENTINI, 1994).



Figura 2. Sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*.

A sardinha-verdadeira atinge a maturidade sexual com comprimento total entre 160-170 mm, com aproximadamente um ano e meio de vida, estando todos os indivíduos da população maduros com 210-220 mm (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). O processo de maturação, desova e recuperação gonadal ocorre na primavera-verão (outubro-março) (Figura 3), sendo que o pico da desova incide sobre os meses de dezembro e janeiro, quando se observa frequência máxima de indivíduos desovantes. Estas desovas ocorrem em regiões em que a temperatura do oceano se torna relativamente homogênea (entre 22 e 26°C) (MATSUURA, 1983). A espécie manifesta uma estratégia de desova parcelada, em que cada fêmea desova vários lotes de ovócitos durante uma única estação, com fecundidade parcial média variando entre 30.000 e 40.000 ovócitos por fêmea, por desova. O intervalo entre uma desova e outra, varia entre quatro e onze dias. Os ovos são livres, plancônicos e flutuantes, apresentam forma esférica, com diâmetro médio de 1,20 mm, podendo variar de 1,00 a 1,40 mm (SACCARDO; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 1991).

Quanto aos locais de desova e crescimento, estudos mostram a ocorrência de ovos e de larvas ao longo de toda a sua área de distribuição, indicando que a espécie apresenta ampla área reprodutiva (GARCIA, REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2015; GIGLIOTTI, et al., 2010). As desovas ocorrem durante o período da noite, com tempo médio de eclosão de aproximadamente 19 h em temperatura de 24 °C. A

maior densidade de ovos é encontrada na região costeira, até 20 milhas náuticas, enquanto que a maior concentração de larvas é geralmente observada desde a região costeira até próximo à margem da plataforma continental (MATSUURA, 1998).

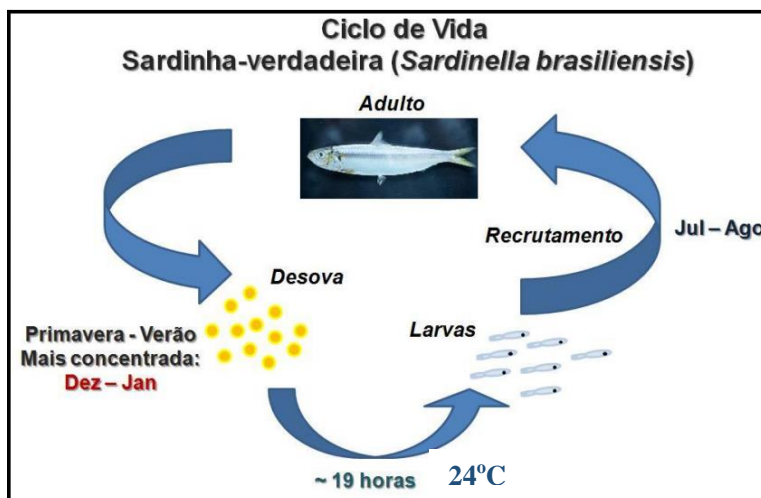


Figura 3. Ciclo de vida da Sardinha-verdadeira. Adaptado de Martí (2012).

O estágio larval abrange exemplares planctônicos entre 3,5 e 19 mm. O tamanho de 19 mm que ocorre considerável mudança nas proporções corporais, é considerado como o fim do estágio larval e, após esse comprimento, inicia-se o estágio pré-juvenil, no qual atinge um tamanho de até 30 mm, e com 45 dias, os juvenis já podem medir até 40 mm (YONEDA, 1987).

O processo de recrutamento biológico ocorre nos meses de julho e agosto, quando os juvenis com cerca de meio ano de vida e aproximadamente 90 mm de comprimento, deslocam-se em direção ao mar aberto para incorporarem-se ao cardume de peixes adultos (SCHWARTZLOSE et al., 1999).

Quanto à alimentação, as larvas e os juvenis (13-65 mm), a dieta é composta por pequenos copépodes dos gêneros *Oncaea*, *Calanus*, *Euterpina* e *Corycaeus*, diatomáceas como *Coscinodiscus*, *Paralia*, *Triceratium*, *Melosira*, *Navicula* e *Pleurosigma* e dinoflagelados como *Peridinium* e *Ceratium*. Os náuplios de copépodes constituem o item mais importante, seguido por ovos de invertebrados, copepoditos e

copépodes adultos (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). O espectro alimentar aumenta com o desenvolvimento larval, nitidamente após a fase de pós-flexão. Os indivíduos pré-adultos e adultos apresentam flutuações sazonais em suas dietas, sendo que no outono e na primavera sua presa predominante é o zooplâncton (74,2% do volume alimentar), e no inverno ocorre uma mudança, quando o fitoplâncton passa a representar 66% da sua dieta (SCHNEIDER; SCHWINGEL, 1999).

Ecologicamente, a sardinha-verdadeira é um recurso de base na cadeia alimentar, tendo um importante papel trófico para diversos consumidores do ecossistema, incluindo alguns recursos pesqueiros de interesse comercial (GASALLA, 2004). Em termos econômicos, é um dos principais recursos pesqueiros marinhos do Brasil, responsável pela manutenção das maiores cadeias de processamento industrial de pescados, os enlatados de atum e de sardinha. O primeiro processo envolve a utilização de juvenis de sardinha como fonte de isca-viva para a captura do atum; (bonito-listrado) e afins e o segundo envolve a pesca de indivíduos adultos e seu processamento (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011; TURA; KATSURAGAWA, 2011).

1.3. Isca-Viva

A pesca de vara e isca-viva utiliza pequenos peixes pelágicos, principalmente juvenis de sardinha-verdadeira com comprimento compreendido entre 30 e 140 mm e por peixes da família Engraulidae (manjubas), para atrair os cardumes de tunídeos para perto das embarcações, otimizando a pescaria (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011; OCCHIALINI, 2013). A isca-viva é capturada por redes de cerco, sendo imediatamente transferida para a embarcação e colocada em tinas com fluxo contínuo de água do mar. A isca é mantida viva durante a busca dos cardumes de bonito-listado para, então, ser lançada ao mar. CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

O estresse da captura, a manipulação incorreta a bordo, a contaminação das tinas, as alterações bruscas da temperatura e salinidade da água circulante, a alta densidade e a alimentação inadequada, constituem os principais fatores que contribuem para elevada perda (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011) que varia de 50 a 100%. Poucos estudos sobre a captura de isca-viva nas regiões Sudeste e Sul foram desenvolvidos para estimar a quantidade usada pela frota atuneira, destacando-se o trabalho realizado por Lin (1992) e Santos; (2005) os quais, analisaram a variabilidade das áreas de captura, os

totais capturados e a composição de espécies de isca para em determinados períodos da década de 80 e de 90, respectivamente. Em um estudo recente, Occhialini (2013) estimou a demanda de isca-viva em 1.482 toneladas por ano, algo em torno de 760 milhões de indivíduos. O sucesso da pescaria do bonito-listrado depende da relação positiva entre a captura de isca-viva e do bonito-listrado, sendo que a atividade se encontra ameaçada não pela limitação do estoque da espécie-alvo, mas pela disponibilidade de isca-viva, (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

2. MANEJO ALIMENTAR

O objetivo da alimentação dos peixes é fornecer as necessidades nutricionais para uma boa saúde, ótimo crescimento, ótimo rendimento e mínimo desperdício dentro de custos razoáveis, de modo a otimizar os lucros (SCHMITTOU; JIAN; CRAMBER, 1998).

A determinação do manejo alimentar adequado (quantidade e intervalo de alimentação) de uma espécie, deve considerar um conjunto de fatores, tais como: quantidade e qualidade do alimento, tamanho, hábito alimentar, tempo de esvaziamento gástrico, comportamento e fisiologia digestiva da espécie, propriedades organolépticas do alimento, temperatura da água, oxigênio dissolvido e sistema de criação (LOVELL, 1998; FRASCA-SCORVO; CARNEIRO; MALHEIROS, 2007).

O correto manejo alimentar sem o comprometimento sanitário, é indispensável na piscicultura, pois o excesso de alimento, além de provocar alterações metabólico-digestivas, implica a deterioração da qualidade da água. Já a alimentação deficiente resulta em baixo índice de crescimento e acentuada variação entre os indivíduos (LOURES et al., 2001).

Uma vez que o custo com a ração representa o principal gasto referente à aquicultura é essencial estabelecer uma estratégia de alimentação baseada na frequência e taxa de alimentação ideais para maximizar o crescimento e a conversão alimentar dos peixes, assim como reduzir a heterogeneidade de tamanho dos animais (SCHNAITTACHER; KING; BERLINSKY, 2005) garantindo assim o sucesso econômico e a sustentabilidade da produção de peixes (CHO; BUREAU, 2001).

O interesse no uso de estratégias nutricionais para maximizar a produção, minimizando os custos de produção e o lançamento de influentes e consequentemente o impacto ambiental das operações aquícolas tem crescido consideravelmente ao longo das últimas duas

décadas. Melhorias muito significativas na qualidade das rações e nas práticas de alimentação foram alcançadas através da determinação de frequência e taxas alimentares ideais para várias espécies de peixes cultivadas.

2.1. Frequência Alimentar

A frequência alimentar representa o número diário de alimentações para o bom desenvolvimento dos peixes. É um fator determinante na sobrevivência, no crescimento, na conversão alimentar e na composição corporal dos mesmos (VOLKOFF; PETER, 2006) e um fator a ser considerado nos custos de produção e na qualidade da água nos cultivos intensivos (BOOTH et al., 2008; DAVIES; INKO-TARIAH; AMACHREE, 2006).

O estabelecimento da frequência do fornecimento da ração não só estimula o peixe a procurar o alimento em momentos pré-determinados, mas também melhora a eficiência alimentar, incrementa o ganho em peso, além de possibilitar maior oportunidade de observação do estado de saúde dos peixes (CARNEIRO; MIKOS, 2005).

Uma frequência alimentar insuficiente leva ao crescimento lento e alta mortalidade de peixes, enquanto que um aumento de frequência geralmente melhora a eficiência da produção, melhorando o crescimento e minimizando o desperdício de ração ((BISWAS et al., 2006; XIE et al., 2011). No entanto, o excesso de alimentação leva não só à redução da eficiência alimentar e ao aumento dos custos de produção, mas também à acumulação de resíduos que afetam negativamente a qualidade da água (BISWAS et al., 2006).

Muitos estudos confirmam que existe uma frequência alimentar ideal para cada espécie cultivada e esta varia de acordo com o hábito alimentar, o tamanho do peixe e as condições de cultivo (BISWAS et al., 2006; CHO et al., 2003; LEE; HWANG; CHO, 2000). A frequência alimentar ideal pode ser diretamente relacionada à eficiência alimentar, visto que intervalos de alimentação adequados permitem melhor ingestão, digestão e assimilação do alimento (BISWAS; TAKEUCHI, 2003). Além disso, o intervalo de alimentação mais eficiente é também influenciado pela taxa de evacuação gástrica das espécies e a rapidez com que o apetite retorna após a alimentação (LEE; HWANG; CHO, 2000; RICHE et al, 2004; BALLAGH; PANKHURST; FIELDER, 2008; XIE et al., 2011).

Quanto ao hábito alimentar da espécie, geralmente os peixes onívoros, herbívoros ou frugívoros procuram o alimento com maior frequência por apresentarem limitação na capacidade de armazenamento de alimento e a alimentação deve ser dividida em mais vezes durante o dia. Já as espécies carnívoras possuem estômago grande e podem ingerir grande quantidade de alimentos num único momento, mantendo-se saciados por um longo período (CARNEIRO; MIKOS, 2005).

Por exemplo, para uma espécie frugívora como o tambaqui, *Colossoma macropomum*, três refeições diárias proporcionam maior taxa de crescimento de juvenis quando comparado a duas refeições (SILVA; BRANDÃO; GOMES, 2007). Para peixes onívoros como a carpa Gibel, *Carassius gibelio*, 24 refeições diárias proporcionaram melhor taxa de crescimento e eficiência alimentar (ZHOU et al., 2003); para a pandora comum, *Pagellus erythrinus*, a frequência alimentar de duas vezes por dia apresenta maior ganho de peso em comparação a uma, três e quatro alimentações diárias (MIHELAKAKIS; YOSHIMATSU; TSOLKAS, 2001) e para o peixe-leite, *Chanos chanos*, oito refeições diárias proporcionam maior crescimento e eficiência alimentar (CHIU; SUMAGAYSAY; SASTRILLO, 1987). Para espécies carnívoras como o robalo asiático, *Lates calcarifer*, uma frequência alimentar de duas vezes ao dia resultou em melhor crescimento e eficiência alimentar quando comparada com a de três ou quatro vezes ao dia (SALAMA, 2008).

Quanto à fase de desenvolvimento, maior frequência alimentar proporciona melhor desempenho nos peixes mais jovens em relação aos adultos. Este fator pode ser justificado pelo fato dos peixes nas fases jovens apresentarem elevadas exigências nutricionais e baixa capacidade digestiva (XIE et al., 2011).

A influência da frequência alimentar no desempenho de peixes vem sendo estudada para várias espécies cultivadas, onde foram determinadas as frequências alimentares ideais, por meio da avaliação de diferentes parâmetros de desempenho tais como crescimento, eficiência alimentar, coeficiente de variação, composição centesimal (BOOTH et al., 2008; KOUSOULAKI et al., 2007; LIANG; CHIEN, 2013; LUO et al., 2015; RICHE et al., 2004; SCHNAITTACHER; KING; BERLINSKY, 2005; WANG; XU; KESTEMONT, 2009; WANG et al., 2007) e atividade específica de enzimas digestivas (XIE et al, 2014).

2.2. Taxa de Alimentação

A taxa de alimentação, também conhecida como taxa de arraçoamento, é a relação entre a quantidade de alimento a ser fornecida diariamente e a biomassa de peixes (BARBOSA; NEVES; CERQUEIRA, 2011). O peixe ajusta as suas taxas de consumo de alimento para satisfazer as suas necessidades metabólicas. Essa taxa pode influenciar diretamente o retorno econômico no cultivo, pois o arraçoamento aquém das necessidades fisiológicas pode resultar no baixo desempenho animal, o que aumenta o tempo de cultivo para a obtenção do peso de mercado. O excesso de ração fornecida pode acarretar, além da perda monetária relacionada ao desperdício de ração, a deterioração da qualidade de água e maior impacto ambiental (MEURER et al., 2005) enquanto que uma subalimentação causa uma grande competição pelo alimento, dando origem a uma sensível variação no tamanho dos peixes e, conseqüentemente, a um baixo índice de crescimento (CASTAGNOLLI, 1979).

A determinação da taxa de alimentação deve associar o ganho em peso, a eficiência alimentar, o retorno econômico e a qualidade da água. A taxa de alimentação a ser fornecida a uma dada espécie varia com o tempo durante o ciclo de produção em função da qualidade da água, do alimento, da densidade de estocagem, do fotoperíodo e, principalmente, da temperatura da água, do tamanho dos peixes e da atividade das enzimas digestivas (HUNG, CONTE, HALLEN, 1993; SHIMENO et al., 1997; KUBITZA; LOVSHIN, 1999; HARPAZ et al., 2005; WANG; XU; KESTEMONT, 2009) e deve ser ajustada segundo as condições individuais de cada unidade de cultivo.

A temperatura da água é uma das variáveis ambientais mais importantes que afeta diretamente o metabolismo, o crescimento e outros processos fisiológicos dos organismos aquáticos (JIAN; CHENG; CHEN, 2003). A temperatura ideal aumenta a taxa metabólica e a demanda por alimento, enquanto que em baixas ou altas temperaturas as taxas metabólicas são suprimidas resultando em baixas taxas de alimentação e crescimento (BAUM et al., 2005; XIA; LI, 2010).

Quanto ao tamanho, larvas e juvenis, com taxas de crescimento rápidas, requerem mais energia e proteína por unidade de peso e possuem maior capacidade de consumo que os adultos (MOREIRA et al., 2001).

A habilidade do peixe em digerir e absorver partículas de alimento depende da presença e da quantidade apropriada de enzimas digestivas no trato gastro intestinal, assim como da natureza física e

química do alimento. O trato digestório dos peixes contém as enzimas digestivas comuns – e.g. proteases, amilases e lipases – (CYRINO et al, 2010) que, entretanto, varia entre espécies, o que pode ser influenciada pelo tamanho, hábito alimentar, assim como pela quantidade e composição da dieta (PERÉS; ZAMBONINO; CAHU, 1998). O estudo da atividade das enzimas digestivas permite o conhecimento da capacidade digestiva e a eficiência do peixe em usar componentes da dieta, podendo ser usada como uma ferramenta na determinação de protocolo de alimentação em peixes (SUAREZ et al. 1995; BUDDINGTON; KROGDAHL; BAKKE-MCKELLEP, 1997). Por exemplo, uma correlação positiva entre a taxa de alimentação e a atividade enzimática foi relatada por SHIMENO et al. (1997) em estudo com juvenis de carpa comum, *Cyprinus carpio*.

Adicionalmente, a concentração dos metabólitos em diferentes compartimentos do corpo, pode refletir a utilização de nutrientes na dieta (LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004). Uma redução significativa nos valores de proteínas totais foi observada em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* alimentados com a menor taxa de alimentação, sendo relacionada com o catabolismo proteico para produção de energia (CHAGAS et al., 2005); Maior concentração de colesterol, triglicerídeos e proteínas totais no plasma foram relatada em juvenis de carpa-comum, *Cyprinus carpio* alimentados com altas taxas de alimentação (SHIMENO et al. 1997).

A taxa de alimentação deve ser ajustada com uma periodicidade semanal ou quinzenal, dependendo da taxa do crescimento do peixe. Peixes pequenos têm uma taxa metabólica muito maior e crescem a um ritmo muito mais rápido em relação aos adultos, portanto suas taxas precisam ser ajustadas com mais frequência.

Considerando que a taxa de alimentação influencia diretamente no crescimento e na eficiência alimentar de uma espécie, os estudos das necessidades nutricionais de peixes devem ser conduzidos na melhor taxa de alimentação possível, a fim de evitar o mascaramento das necessidades dos nutrientes. A taxa de alimentação vem sendo estudada para várias espécies cultivadas. Na Tabela 1 estão sumarizados alguns estudos já realizados com várias espécies de peixes, em que foram determinadas as taxas de alimentação ideais.

Tabela 1. Taxa de alimentação ideal para várias espécies de peixes cultivadas

Espécie	Fase da vida (Peso inicial, g)	TA ideal (%PV.dia ⁻¹)	Referência
<i>Acipensor transmontanus</i>	Juvenil (360 ± 12)	1,5	LEE et al. (2015)
<i>Salmo salar</i>	Juvenil (90 ± 2,5)	1,6	SUN et al. (2016)
<i>Huso huso</i>	Juvenil (900 ± 9,2)	2,0	MOHSENI et al. (2006)
<i>Sparus aurata</i>	Larva (3,0 ± 0,43)	2,3	MIHELAKAKIS; TSOLKAS; YOSHIMATSU (2002)
<i>Mystus nemurus</i>	Larva (12,1 ± 0,1)	2,5	NG et al. (2000)
<i>Epinephelus coioides</i>	Juvenil (10,31 ± 0,36)	2,5	LUO et al. (2006)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Juvenil (±3,6)	2,6	KIM; KIM; KANG (2007)
<i>Linanda ferruginea</i>	Juvenil (7,40 ± 0,08)	3,0	PUVANENDRAN; BOYCE; BROWN (2003)
<i>Centropomus parallelus</i>	Juvenil (9,80 ± 0,41)	3,0	OLIVEIRA et al. (2013)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Larva (2,6 ± 0,3)	3,0	EROLDOĞAN; KUMLU; AKTAŞ (2004)
<i>Chanos chanos</i>	Juvenis (± 5)	4,0	SUMAGAYSAY; BORLONGAN (1995)
<i>Heteropneustes fossilis</i>	Larva (7,90 ± 0,55)	4,0-4,5	AHMED (2010)
<i>Nibea mitchthioides</i>	Juvenil (38,3 ± 0,2)	5,0	WANG et al. (2007)
<i>Acipensor medirostris</i>	Alevino (1,63 ± 0,0)	7,1	ZHENG et al. (2015)
<i>Trachinotus marginatus</i>	Juvenil (4,8 ± 0,6)	8,0	DA CUNHA et al. (2013)
<i>Odontesthes argentinensis</i>	Juvenil (0,1)	9,0	TESSER; SAMPAIO (2006)
<i>Rachycentron canadum</i>	Juvenil (±10)	9,0	SUN et al. (2006)

TA: taxa de alimentação ideal; PV: peso vivo por dia

3. JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de várias espécies de peixes marinhos com extraordinário potencial para a aquicultura, são recentes os esforços para obtenção de dados que permitam a adequada orientação da produção comercial. Até o momento, a busca pela detenção de tecnologia de cultivo de peixes marinhos, está direcionada principalmente a peixes de alto valor comercial. Em geral são peixes carnívoros, consumindo dietas de alto valor proteico, dependendo exclusivamente da oferta da farinha e óleo de peixe.

A sardinha-verdadeira é o principal recurso pesqueiro do Brasil em produção (MPA, 2014), cuja distribuição e disponibilidade para a pesca estão relacionadas às oscilações oceanográficas, que podem determinar deslocamento de cardumes, que associadas ao intenso esforço de pesca, e adição de tecnologias como sonares e/ou ecosondas levou a uma redução dos estoques naturais, com importantes reflexos sociais e econômicos. Atualmente, a pesca da sardinha-verdadeira é proibida durante cinco meses do ano, durante os picos de reprodução e de recrutamento (Instrução Normativa IBAMA nº 15, de 21 de maio de 2009), o que leva a indústria de conservas a importar matéria prima para suprir a demanda.

Considerando que até o momento não existem espécies alternativas viáveis para substituir, na sua totalidade, o uso da sardinha-verdadeira como isca-viva para a captura de atuns e afins pelo sistema de vara e anzol com isca-viva, a piscicultura marinha surge como alternativa para a produção da sardinha-verdadeira, o que irá proporcionar o aumento da produção pesqueira tanto para a pesca de atum, como isca-viva, assim como a pesca da sardinha pela maior disponibilidade dos recursos que atualmente são fatores limitantes a essas pescarias. Do ponto de vista ambiental, a produção da sardinha-verdadeira em cativeiro poderá apoiar o processo de recuperação dos estoques naturais. É desta ideia que foi estruturado o PROJETO ISCA-VIVA, que contou com a participação da UFSC, Cepsul-IBAMA e UNIVALI, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes/MEC), com o objetivo de contribuir com o processo de gestão pesqueira, desenvolvendo ações de monitoramento ambiental e técnicas de produção e manejo de juvenis de sardinha-verdadeira, com vistas ao uso sustentável do recurso e a manutenção das maiores cadeias de processamento industrial de pescados no Brasil.

Entre as ações desenvolvidas por este projeto destacam-se o diagnóstico da pesca de isca-viva empregada pela frota atuneira que opera no sudeste e sul do Brasil, por meio da avaliação das características da frota atuante; da caracterização da captura e estimativa da demanda e mortalidade das iscas-vivas; a avaliação dos efeitos e eficácia de agentes anestésicos em juvenis e adultos e a determinação da concentração mínima necessária para a anestesia; acompanhamento do crescimento, da maturação, desova e larvicultura através de juvenis capturados no ambiente natural e mantidos em confinamento até a idade de primeira maturação; distribuição espacial do ictioplâncton da sardinha-verdadeira; análise da viabilidade econômica do cultivo da sardinha-verdadeira; cultivo em tanques-rede no mar e determinação das exigências de proteína, carboidratos e lipídios. Entretanto, não existem informações sobre o manejo alimentar no cultivo da sardinha-verdadeira.

Em aquicultura, estudos que contribuam para compreender aspectos nutricionais e de manejo alimentar são de extrema importância, visto que a alimentação representa o maior custo econômico na produção. O manejo alimentar em aquicultura, é de relevada importância no que se refere ao êxito da atividade, visto que, influencia seu desenvolvimento dos peixes, pois está diretamente ligado tanto ao fornecimento da ração e sua utilização, quanto ao custo com a mão-de-obra, e desta forma, diretamente ligada à viabilidade econômica.

No cultivo de "novas espécies" é importante o conhecimento dos níveis ideais destes parâmetros para o estabelecimento de um protocolo alimentar, no qual o produtor almeja somar a maximização do crescimento e da conversão alimentar, para a obtenção de maior lucro e redução dos custos de produção.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Contribuir para o conhecimento do manejo alimentar no cultivo de juvenis de sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*.

4.2. Específicos

Determinar a frequência alimentar ideal para juvenis da sardinha-verdadeira com base no crescimento e composição centesimal.

Determinar a taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira com base no crescimento, composição centesimal, parâmetros metabólicos plasmáticos e atividade enzimática.

5. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese é dividida em dois capítulos: o primeiro capítulo é um artigo original, formatado segundo normas da revista *Aquaculture Research* (B1, fator de impacto 1.606) e o segundo capítulo é um artigo original, formatado segundo normas da revista *Aquaculture Nutrition* (B1, fator de impacto 1.511).

CAPÍTULO I

Efeito da frequência alimentar no crescimento, eficiência alimentar e composição corporal em juvenis de sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner 1879)

Manecas Baloi^{a,b,*}, Cristina Vaz Avelar de Carvalho^b, Fabio Carneiro Sterzelecki^b, Gabriel Passini^b, Vinicius Ronzani Cerqueira^b

^a *Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras, Universidade Eduardo Mondlane, Av.1º de Julho 128, Quelimane, Moçambique.*

^b *Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Piscicultura Marinha, Florianópolis, SC, CEP 88062-601, Brasil.*

*Autor correspondente: M Baloi, Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras, Universidade Eduardo Mondlane, Av.1º de Julho 128, Quelimane, Moçambique.

E-mail: cmbaloi@gmail.com

Resumo

A sardinha-verdadeira é o recurso pesqueiro mais importante do Brasil e sua produção tem flutuado ao longo dos últimos 30 anos, devido a sobrepesca, fenômenos climáticos e oceanográficos. O presente trabalho foi realizado com objetivo de determinar a frequência alimentar ideal no cultivo de juvenis de sardinha-verdadeira com base no crescimento, eficiência alimentar e composição centesimal. Seis frequências alimentares (uma, duas, três, quatro, cinco e seis vezes por dia) foram avaliadas em triplicata durante 50 dias. Peixes com peso médio inicial de $3,27 \pm 0,56$ g foram alimentados diariamente até a saciedade aparente. Os resultados mostraram significativamente ($P < 0,05$) que os peixes alimentados uma vez por dia apresentaram menor ganho em peso, taxa de crescimento específico e fator de condição e maior taxa de eficiência alimentar, quando comparada com os demais tratamentos. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) no coeficiente de variação do peso entre os tratamentos. O consumo de ração foi diretamente proporcional à frequência alimentar. Os peixes alimentados uma vez por dia apresentaram menores índices hepato-somático e de gordura mesentérica comparando com demais tratamentos. Não houve diferença significativa no conteúdo da proteína bruta e de cinzas entre os tratamentos. O teor de lipídios aumentou significativamente com o aumento da frequência alimentar, enquanto que a umidade mostrou uma tendência oposta. Os resultados deste estudo sugerem que a frequência alimentar ideal para os juvenis de sardinha-verdadeira é de pelo menos duas vezes por dia.

Palavras-chave: Sardinha-verdadeira, frequência alimentar, consumo alimentar, crescimento, composição centesimal.

Abstract

The Brazilian sardine is the most important fishery resource in Brazil and their production has floated along the last 30 years due the overfishing, climatic and oceanographic phenomena. This study was carried out to determine the optimal feeding frequency for juvenile Brazilian sardine based on growth, feed efficiency, feed intake and body composition. Six feeding frequencies (one, two, three, four, five and six times a day) were evaluated in triplicate tanks for 50 days. Fish with

initial mean weight of 3.29 ± 0.56 g were fed daily to apparent satiation. The results showed that fish fed once daily had lower ($P < 0.05$) body weight gain, specific growth rate and condition factor compared with other treatments. The feed efficiency ratio in fish fed once daily was significantly higher than those fed two or more times a day. No significant differences ($P > 0.05$) were observed in the coefficient of variation in body weight among the treatments. Feed intake was directly proportional to the feeding frequency. Fish fed once daily showed lower hepatosomatic and mesenteric fat indices than the other treatments. Neither protein nor ash content of fish were significantly affected by feeding frequency. However, Whole-body lipid content increased significantly as the feeding frequency increased, while moisture content showed an opposite trend. The results suggest that the optimal feeding frequency for juvenile Brazilian sardine is at least twice daily.

Keywords: Brazilian sardine, feed frequency, feed intake, growth, body composition

1. Introdução

A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) é um dos recursos pesqueiros marinhos mais importantes capturados ao longo da plataforma continental da região Sul e Sudeste do Brasil. Sustenta diretamente a indústria de enlatados, como matéria prima, e indiretamente a pesca do bonito listrado (*Katsuwonus pelamis*) e afins, pois juvenis destes peixes são utilizados como isca-viva (Cergole, Saccardo & Rossi-Wongtschowski 2002). Pertence à família Clupeidae e ocorre na área entre Cabo de São Tomé - Rio de Janeiro (22° S) e Cabo de Santa Marta - Santa Catarina (29° S), (Jablonski 2007). As capturas comerciais começaram no final dos anos 50, e se desenvolveram rapidamente até 1973, quando atingiram um montante recorde de 223 mil toneladas anuais (Cergole *et al.*, 2002). No entanto, em 2011, a produção foi de apenas 75 223 toneladas (MPA-Ministério da Pesca e Aquicultura 2014). O colapso da pesca da sardinha pode ser atribuído a uma combinação da sobrepesca, eventos oceanográficos, mudanças climáticas, dentre outros efeitos, como os de origem biológica (Cergole *et al.*, 2002).

As flutuações na captura da sardinha-verdadeira levaram ao desenvolvimento de pesquisas de tecnologia que visam a sua produção em cativeiro com vista ao uso sustentável do recurso e à manutenção das

maiores cadeias de processamento industrial de pescados no Brasil. Recentes tentativas de reprodução de sardinha-verdadeira em cativeiro resultaram na primeira produção de larvas no Brasil (Passini, Silva, Carvalho, Sterzelecki, Cerqueira, 2013). Uma vez que foi possível a realização da larvicultura com sucesso até a obtenção de juvenis torna-se importante estabelecer um programa de manejo alimentar que garanta um bom desempenho zootécnico.

A alimentação de peixes é um dos fatores mais importantes na piscicultura comercial, uma vez que a ração representa o principal gasto referente à aquicultura (Schnaittacher, King & Berlinsky 2005; Frasca-Scorvo, Carneiro & Malheiros 2007). Nesse sentido, destaca-se a importância do estabelecimento de um manejo alimentar adequado e uso de rações de qualidade compatível com as diferentes fases de desenvolvimento e hábito alimentar do peixe, bem como com o sistema de cultivo utilizado.

A frequência alimentar é um fator importante dentro do manejo alimentar por estimular o peixe a procurar pelo alimento em momentos pré-determinados, podendo contribuir para o aumento da eficiência alimentar, do ganho em peso, além de possibilitar maior oportunidade de observação do estado de saúde dos peixes. Muitos estudos têm confirmado a existência de uma frequência alimentar ideal, na qual ocorre melhor ingestão, digestão e assimilação de alimentos. A frequência alimentar ideal para o máximo crescimento dos peixes geralmente varia com a espécie, fase de desenvolvimento e sistema de cultivo (Lee, Cho & Kim 2000; Cho, Lim, Lee, Lee, Park & Lee 2003; Biswas, Jena, Singh, Patmajhi & Muduli 2006).

Uma maior frequência alimentar pode ser vantajosa para um maior crescimento e sobrevivência em peixes mais jovens (Biswas *et al.*, 2006). No entanto, a alimentação excessiva, não só reduz a eficiência alimentar e aumenta os custos de produção, mas também reduz a absorção de nutrientes pelos peixes, o que pode resultar em excesso de matéria orgânica nos sistemas de produção, afetando negativamente a qualidade da água (Lee *et al.* 2000; Tucker, Booth, Allan, Booth & Fielder 2006). Enquanto isso, a baixa frequência alimentar pode não garantir alimento suficiente para os peixes sustentarem o seu crescimento normal e sobrevivência, aumentando a heterogeneidade de tamanhos e as taxas de canibalismo (Dwyer, Brown, Parrish & Lall 2002; Booth, Tucker, Allan & Fielder 2008).

O presente trabalho foi realizado com objetivo de determinar a frequência alimentar ideal no cultivo de juvenis de sardinha-verdadeira com base no crescimento, eficiência alimentar e composição centesimal.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material biológico

O estudo foi realizado entre julho e agosto de 2013 (duração de 50 dias) no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Os peixes utilizados neste estudo foram produzidos no LAPMAR através da indução hormonal a partir de reprodutores selvagens ($n = 40$) mantidos em cativeiro. Para a indução foi aplicada uma dose de $75\mu\text{g.Kg}^{-1}$ do análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante (des-Gly10, [D-Ala6] LH-RH Etilamida), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em soro fisiológico (0,9 % de NaCl). Os indivíduos receberam uma única injeção intraperitoneal com auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL, na musculatura abaixo do centro da nadadeira dorsal. Depois da indução hormonal, os peixes foram mantidos em um tanque de 2000 L. A desova foi natural e a coleta dos ovos foi realizada a partir de uma saída de água na parte superior do tanque dos reprodutores, conectada a um recipiente cilíndrico de 36 L com tela de 200 μm na parte inferior do coletor. As larvas foram cultivadas em tanque circular de 5 m^3 em condições de criação intensiva. Resumidamente, a alimentação larval começou no segundo dia após a eclosão com rotíferos, *Brachionus* sp., cultivado em leveduras e microalgas, seguindo com náuplios de *Artemia* enriquecidos com emulsão *DC DHA SELCO* (INVE Aquaculture, Bélgica) e, posteriormente, com dieta artificial (55% de proteína bruta, 4160 kcal kg^{-1} de energia, NRD, INVE Aquaculture, Bélgica).

2.2. Procedimentos experimentais

Juvenis de sardinha com 98 dias foram usados neste estudo. Um total de 2880 peixes ($3,27\pm 0,56$ g e $7,4\pm 0,5$ cm) foram distribuídos em 18 tanques de 400 L em sistema de fluxo contínuo de água ($1,0 \text{ L.min}^{-1}$) a uma densidade de 0,4 peixes. L^{-1} (160 peixes por tanque). Todos os tanques estavam alocados dentro de uma estufa. Seis frequências alimentares de uma a seis vezes ao dia foram avaliadas em um delineamento experimental causalizado em triplicata. Os peixes foram alimentados manualmente entre as 8:00 e 18:00 h (Tabela 2) com ração comercial (50% PB e 4160 kcal. kg^{-1} de energia, NRD, INVE, Aquaculture, Bélgica) até saciedade aparente (momento em que

verificou-se menor voracidade na busca pela ração) e a quantidade fornecida foi registrada a cada alimentação. A limpeza dos tanques (sifonagem) para retirada dos eventuais resíduos orgânicos foi realizada diariamente.

Tabela 1. Protocolo alimentar de juvenis de sardinha-verdadeira durante o período experimental

Tratamento	Frequência	Horário de alimentação (horas)
F1	Uma	08:00
F2	Duas	08:00, 18:00
F3	Três	08:00, 12:00, 18:00
F4	Quatro	08:00, 12:00, 14:00, 18:00
F5	Cinco	08:00, 10:00, 12:00, 16:00, 18:00
F6	Seis	08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00

Durante todo o período experimental, a temperatura da água e fotoperíodo (10L:14E) foram mantidos em condições naturais. A temperatura ($17,9 \pm 1,69$ °C) e o oxigênio dissolvido ($5,02 \pm 0,91$ mgL⁻¹) foram monitorados diariamente (8:00 e 17:00 h) usando um oxímetro portátil HI 9146 (HANNA Instruments Brasil, SP, Brasil). O pH ($7,68 \pm 0,10$) e a salinidade ($35,00 \pm 0,23$ gL⁻¹) foram monitorados semanalmente usando um pHmetro (AT 315 Microprocessado, Alfakit Ltda., Florianópolis, Brasil) e um refratômetro portátil (Instrutherm RTS-101ATC-03137, Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda., São Paulo, Brasil) respectivamente. A amônia total e o nitrito (kits Indotest Alfakit Ltda., Florianópolis, Brasil) foram monitorados a cada quinze dias ao longo do experimento e estiveram abaixo de 0,5 mg.L⁻¹.

Foram realizadas três biometrias a cada 15 dias, antecedidas por um período de 24 h de jejum. Em cada biometria, os peixes foram pesados em balança de precisão (0,01 g) e medidos individualmente usando uma régua graduada, previamente anestesiados com benzocaína (35 mg.L⁻¹).

No final do experimento, dez peixes de cada tanque foram, anestesiados com benzocaína (100 mg.L⁻¹) pesados e sacrificados para a retirada do fígado e gordura mesentérica, para determinação dos índices hepatossomático e gordura mesentérica. Todos os procedimentos de manuseio dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC, PP00861/CEUA/PROPESQ/2013).

2.3. Composição centesimal

Cerca de 100 g de peixes foram coletados no início do experimento, sacrificados com uma overdose de benzocaína (100 mg.L^{-1}) e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análise da composição centesimal. No final do experimento, outras 100 g de peixes de cada tanque foram sacrificados para a mesma análise. A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl (Auto Kjeldahl System (VAP500T/TT125; Gerhardt, Königswinter, Alemanha); lipídios, através do método de extração de éter; cinzas, por incineração em mufla a 550°C durante 4 h; e umidade, obtida através da secagem da amostra em estufa a 105°C durante 24 h (AOAC, 1999).

2.4. Estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância unifatorial (ANOVA), cumprindo os requisitos de normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (Teste de Levene). Os dados percentuais foram transformados para arco-seno antes das análises. Quando foi encontrada diferença significativa entre as médias, o teste de Duncan foi aplicado a um nível de significância utilizado foi de 5%.

3. Resultados

3.1. Parâmetros de crescimento e consumo de ração

Nenhuma mortalidade foi observada nas diferentes frequências alimentares testadas durante todo o experimento. As médias do peso final, ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), eficiência alimentar (EA), fator de condição (FC) e coeficiente de variação (CV) são apresentados na Tabela 3. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o peso final, GP e a TCE dos peixes alimentados duas, três, quatro e cinco vezes por dia, porém esses parâmetros foram menores em peixes alimentados uma vez por dia.

A EA e o FC foram significativamente ($P < 0,05$) afetados pelas frequências alimentares testadas. A maior EA foi obtida nos peixes alimentados uma vez por dia. O maior FC foi observado em peixes alimentados quatro e cinco vezes por dia e o menor em peixes alimentados uma vez ao dia. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no coeficiente de variação do peso dos peixes entre os tratamentos.

Os consumos médios de ração por cada tratamento durante cada horário de alimentação estão apresentados na Figura 4. O consumo de ração no primeiro horário de alimentação (08:00 h) diminuiu com o aumento da frequência alimentar sendo que, os peixes alimentados uma vez ao dia consumiram mais ração nesse horário em relação aos demais. O horário de alimentação teve uma influência sobre o comportamento alimentar dos peixes alimentados duas e três vezes ao dia, os quais apresentaram maior consumo de ração durante a última alimentação em relação à primeira. Os peixes alimentados quatro a seis vezes por dia consumiram menos ração por alimentação em relação aos demais tratamentos. No geral, durante os 50 dias de estudo foi verificado um aumento no consumo de ração com o aumento da frequência alimentar.

3.2. Índices hepato-somático e de gordura mesentérica

Os valores médios obtidos para os índices hepato-somático (IHS) e de gordura mesentérica (IGM) para as diferentes frequências alimentares testadas encontram-se na Tabela 4. Os peixes alimentados uma vez ao dia apresentaram IHS e IGM significativamente menores ($P < 0.05$) em relação aos demais tratamentos.

Tabela 3. Parâmetros de crescimento de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média \pm desvio padrão de três réplicas

Frequência alimentar	GP ¹ (g)	TCE ² (% d ⁻¹)	EA ³ (%)	FC ⁴	CV ⁵ (%) peso final
F1	3,30 \pm 1,32 ^c	1,35 \pm 0,41 ^c	55,24 \pm 0,97 ^a	0,82 \pm 0,08 ^d	20,05 \pm 1,15
F2	4,29 \pm 1,49 ^{ab}	1,63 \pm 0,40 ^{ab}	43,67 \pm 3,35 ^b	0,88 \pm 0,07 ^{bc}	19,64 \pm 0,86
F3	4,39 \pm 1,61 ^{ab}	1,64 \pm 0,43 ^{ab}	38,42 \pm 2,71 ^c	0,87 \pm 0,07 ^c	20,96 \pm 1,67
F4	4,32 \pm 1,50 ^{ab}	1,64 \pm 0,40 ^{ab}	35,60 \pm 1,34 ^{cd}	0,90 \pm 0,08 ^{ab}	19,68 \pm 1,50
F5	4,55 \pm 1,62 ^a	1,69 \pm 0,42 ^a	38,10 \pm 1,86 ^{cd}	0,91 \pm 0,09 ^a	20,71 \pm 2,29
F6	4,08 \pm 1,56 ^b	1,56 \pm 0,45 ^b	32,97 \pm 2,74 ^d	0,89 \pm 0,08 ^{bc}	20,95 \pm 2,24

Peso inicial: 3,25 \pm 0,56g

1. Ganho em Peso (GP, g) = peso final – peso inicial

2. Taxa de Crescimento Específico (TCE, %) = $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias cultivo}] \times 100$

3. Eficiência Alimentar (EA, %) = $[\text{ganho em peso} / \text{quantidade de ração ingerida}] \times 100$

4. Fator de Condição (FC) = $100 \times (\text{peso corporal} / \text{comprimento})^3$

5. Coeficiente de Variação do peso (CV, %) = $100 \times (\text{desvio padrão} / \text{média})$

Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

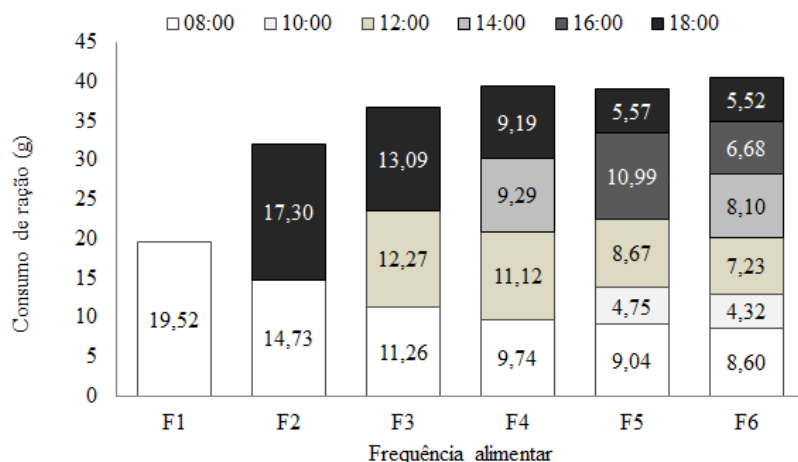


Figura 4. Consumo médio de ração por cada tratamento durante cada horário de alimentação em juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias

Tabela 2. Valores médios obtidos para IHS e IGM de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média \pm desvio padrão de três réplicas.

Frequência alimentar	IHS ¹ (%)	IGM ² (%)
F1	0,57 \pm 0,33 ^b	0,87 \pm 0,66 ^c
F2	0,90 \pm 0,29 ^a	1,28 \pm 0,85 ^b
F3	1,16 \pm 0,94 ^a	1,59 \pm 0,86 ^{ab}
F4	0,92 \pm 0,35 ^a	1,65 \pm 0,93 ^{ab}
F5	0,93 \pm 0,36 ^a	1,82 \pm 0,74 ^a
F6	0,86 \pm 0,44 ^a	1,63 \pm 1,00 ^{ab}

1. IHS = [(peso do fígado / peso corporal) x 100]
 2. IGM = [(peso da gordura mesentérica / peso corporal) x 100]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

3.3. Composição centesimal

A composição centesimal de juvenis de sardinha-verdadeira para as diferentes frequências alimentares está apresentada na Tabela 5. O conteúdo de proteína e cinzas não diferiu significativamente ($P > 0.05$) entre as frequências alimentares testadas. Os peixes alimentados seis vezes por dia apresentaram maior teor de lipídios ($P < 0.05$) quando comparados aos que foram alimentados uma vez por dia, enquanto que o teor de umidade mostrou uma tendência oposta.

Tabela 3. Composição centesimal inicial e final de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média \pm desvio padrão de três réplicas.

Frequência alimentar	Proteína Bruta (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Umidade (%)
Inicial	12,87	2,67	7,38	74,60
Final				
F1	13,70 \pm 0,20	3,72 \pm 0,33	6,97 \pm 0,80 ^c	73,69 \pm 0,42 ^a
F2	14,39 \pm 1,49	3,74 \pm 0,14	8,64 \pm 1,19 ^{ab}	71,13 \pm 0,41 ^{ab}
F3	14,47 \pm 0,24	3,59 \pm 0,17	8,47 \pm 0,66 ^{ab}	71,66 \pm 0,66 ^{ab}
F4	14,07 \pm 0,76	3,73 \pm 0,31	8,36 \pm 0,66 ^{ab}	72,39 \pm 0,68 ^{ab}
F5	14,52 \pm 0,36	3,79 \pm 0,13	9,17 \pm 2,09 ^{ab}	72,07 \pm 0,81 ^{ab}
F6	14,13 \pm 0,66	3,77 \pm 0,09	9,22 \pm 0,97 ^a	70,83 \pm 1,04 ^c
Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$)				

4. Discussão

No presente estudo, a frequência alimentar teve efeito significativo no ganho em peso, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar em juvenis de sardinha-verdadeira. Os resultados obtidos no nosso estudo são consistentes com os obtidos para juvenis de “yellowtail flounder”, *Limanda ferruginea*, robalo asiático *Lates calcarifer*, pargo australiano, *Pagrus auratus* e bagre africano, *Clarias gariepinus* (Dwyer *et al.* 2002; Harpaz, Hakim, Barki, Karplus, Slosman & Eroldogan 2005; Booth *et al.* 2008; Hussein 2012).

Os peixes submetidos a uma única alimentação diária apresentaram menor GP e TCE, o que significa que essa frequência alimentar não satisfaz os requisitos nutricionais e energéticos para manter o seu máximo crescimento somático. Os peixes alimentados mais de uma vez por dia tiveram maior ganho em peso, quando comparados com os peixes que foram alimentados apenas uma vez, mas o aumento do número de alimentações de duas a cinco vezes por dia não diferiu significativamente no ganho em peso. Afigura-se que, sob as nossas condições de cultivo, a frequência alimentar de duas vezes por dia foi suficiente para um bom crescimento visto que, nessa frequência os peixes apresentaram menor consumo de ração, maior eficiência alimentar e maiores intervalos entre os horários de alimentação que proporcionaram melhor ingestão, digestão e assimilação do alimento em comparação com aqueles alimentados de três a seis vezes ao dia.

O aumento da frequência alimentar para três a seis vezes ao dia diminuiu significativamente a EA. Isto indica que o crescimento e a utilização do alimento geralmente aumentam com a frequência de alimentação até um determinado limite. Schnaittacher *et al.* (2005) e Booth *et al.* (2008) afirmam que, quando o intervalo entre as refeições é curto, o alimento passa através do trato digestório mais rapidamente, levando a baixa eficiência digestiva. Além disso, foi relatado que maiores frequências alimentares podem aumentar a atividade natatória dos peixes, levando a um alto gasto energético e uma baixa taxa de crescimento (Johansen & Jobling, 1998).

Assim como no presente estudo, muitos experimentos com juvenis de diversas espécies de peixes apontam a frequência alimentar de pelo menos duas vezes ao dia como a mais efetiva para um bom desempenho dos animais cultivados. Rowland, Allan, Mifsud, Nixon, Boyd e Glendenning (2005) em um trabalho de estratégia alimentar para perca prateada, *Bidyanus bidyanus*, observaram que a máxima frequência alimentar para o maior crescimento foi a de duas vezes por dia. Aumento significativo no ganho em peso e eficiência alimentar foi observado em juvenis da pandora comum, *Pagellus erythrinus*, alimentados duas vezes por dia em comparação a uma, três e quatro alimentações diárias (Mihelakakis, Yoshimatsu & Tsolkas 2001). Para juvenis do linguado do Atlântico, *Hippoglossus hippoglossus*, do linguado japonês, *Paralichthys olivaceus* e da pargo australiano, *Pagrus auratus*, frequências de alimentação de duas ou mais vezes ao dia também foram as mais adequadas para um bom crescimento (Schnaittacher *et al.* 2005; Kim, Kim & Kang 2007; Booth *et al.* 2008).

O coeficiente de variação é um parâmetro usado para distinguir as variações de tamanho, que são induzidas por competição ou efeitos de hierarquia. Tem-se sugerido que alimentações mais frequentes, em uma determinada taxa de alimentação, podem produzir peixes de tamanhos mais uniformes visto que os peixes menores podem ter mais chances de obter alimento (Schnaittacher *et al.*, 2005). No presente estudo, observamos que não houve heterogeneidade significativa de tamanho dos peixes alimentados de uma a seis vezes por dia. Na natureza, a sardinha-verdadeira se agrupa em cardumes compostos por indivíduos provenientes de um grupo da mesma desova abrangendo pequenas amplitudes de peso e comprimento (Rossi-Wongtschowski, 1977), o que ocorre comumente com os clupeídeos (Blaxter & Holliday, 1963).

O fator de condição de Fulton é um parâmetro utilizado para avaliar o grau de bem-estar dos peixes, visto que pode ser determinado com relativa facilidade e rapidez e pode fornecer uma indicação da condição fisiológica dos peixes. No presente estudo o fator de condição foi significativamente menor nos peixes alimentados uma vez por dia do que naqueles alimentados duas ou mais vezes, possivelmente porque o aporte nutricional para estes peixes foi insuficiente para garantir o seu bem-estar (Ratz & Lloret, 2003). Mustać e Sinovčić (2010) relataram que a sardinha do Mediterrâneo, *Sardina pilchardus*, capturada nas águas costeiras do Mar Adriático (Croácia) apresentava melhores condições do que a capturada em águas do mar aberto (“offshore”). A principal razão para valores mais elevados de fator de condição de Fulton em águas costeiras foi atribuída ao fato de maior abundância de alimento, principalmente zooplâncton, em relação às águas do mar aberto. Ganas, Somarakis, Koutsikopoulos e Machias (2007) relataram a mesma situação com a *Sardina pilchardus*. O IHS e IGM dos peixes alimentados uma vez por dia foram menores em relação aos demais tratamentos, o que sugere que nestes peixes durante a restrição alimentar os estoques de gordura foram utilizados para suprir a demanda de energia para o crescimento, e não armazenados como glicogênio hepático ou gordura visceral. Segundo Blaxter e Holliday (1963) os clupeídeos, de modo geral, são comedores sazonais, estocando grandes estoques de gordura para sustentarem-se quando há carência de alimento.

Os resultados do presente estudo mostram que tanto a proteína bruta quanto o conteúdo de cinzas dos peixes não são afetados com o aumento da frequência alimentar. Resultados similares foram observados em juvenis de pandora comum, *Pagellus erythrinus* (Mihelakakis *et al.* 2001) e “*cuneate drum*” *Nibea miichthioides* (Wang,

Kong, Li & Bureau 2007). No entanto, o teor lipídico aumentou com a frequência alimentar corroborando com estudos realizados por Lee, Hwang & Cho (2000); Lee, Cho, *et al.* (2000) e Cho *et al.* (2003). O maior teor de lipídios foi observado em peixes que foram alimentados seis vezes ao dia, indicando que o excesso de alimento consumido foi convertido em gordura corporal.

5. Conclusão

Como em sistemas intensivos a ração é a principal ou a exclusiva fonte de nutrientes para os peixes, e pode representar até 70% dos custos de produção, enfatiza-se a prática de cultivo com um manejo nutricional que garanta o bom crescimento dos peixes em uma abordagem de gestão de baixo custo. Com base nos resultados conclui-se que os juvenis de sardinha-verdadeira alcançam um melhor crescimento e eficiência alimentar quando alimentados duas vezes por dia.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Projeto Isca Viva, número 09/2009). O primeiro autor foi bolsista de doutorado da *TWAS-CNPq Postgraduate Fellowship Programme*. Ao CNPq pelo apoio ao Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR-UFSC) e bolsas aos demais autores. Os autores gostariam de agradecer à toda equipa do LAPMAR-UFSC e em especial a Maria Fernanda Tulcán pelo apoio inestimável na condução do experimento.

Referências

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. Official methods of analysis of official analytical chemists international, 16th ed. Aquac. Soc., 34. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, pp. 85–91.
- Biswas G., Jena J.K., Singh S.K., Patmajhi P. & Muduli H.K. (2006) Effect of feeding frequency on growth, survival and feed utilization in mrigal, *Cirrhinus mrigala*, and rohu, *Labeo rohita*, during nursery rearing. Aquaculture 254, 211–218.

- Blaxter J.H.S. & Holliday F.G.T. (1963). The behavior and physiology of herring and other clupeids. In: *Advances in Marine Biology* (ed. by F.S. Russell), pp. 261–393. Academic Press, London.
- Booth M.A., Tucker B.J., Allan G.L. & Fielder D.S. (2008) Effect of feeding regime and fish size on weight gain, feed intake and gastric evacuation in juvenile Australian snapper *Pagrus auratus*. *Aquaculture* 282, 104–110.
- Cergole M.C., Saccardo S.A. & Rossi-Wongtschowski C.L.D.B. (2002) Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977–1997. *Revista Brasileira de Oceanografia* 50, 13–26.
- Cho S.H., Lim Y.S., Lee J.H., Lee J.K., Park S. & Lee S.M. (2003) Effects of feeding rate and feeding frequency on survival, growth, and body composition of ayu postlarvae *Plecoglossus altivelis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34, 85–91.
- Dwyer K.S., Brown J.A., Parrish C. & Lall S.P. (2002) Feeding frequency affects food consumption, feeding pattern and growth of juvenile yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). *Aquaculture* 213, 279–292.
- Frasca-Scorvo C.M., Carneiro D.J. & Malheiros E.B. (2007) Efeito do manejo alimentar no desempenho do matrinxã *Brycon amazonicus* em tanques de cultivo. *Acta Amazonica* 37, 621–628.
- Ganias K., Somarakis S., Koutsikopoulos C. & Machias A. (2007) Factors affecting the spawning period of sardine in two highly oligotrophic Seas. *Marine Biology* 151, 1559–1569.
- Harpaz S., Hakim Y., Barki A., Karplus I., Slosman T. & Eroldogan O.T. (2005) Effects of different feeding levels during day and/or night on growth and brush-border enzyme activity in juvenile *Lates calcarifer* reared in freshwater re-circulating tanks. *Aquaculture* 248, 325–335.
- Hussein M.H. (2012) Effect of various feeding frequencies on growth performance and previously starved fingerlings and juveniles of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 16, 145–152.
- Jablonski S. (2007) The Brazilian sardine. Is there any room for modeling? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2, 86–93.
- Johansen, S.J.S., Jobling, M., 1998. The influence of feeding regime on growth and slaughter traits of cage-reared Atlantic salmon. *Aquaculture International* 6 (1), 1–17.
- Kim K.D., Kim K.M. & Kang Y. (2007) Influences of feeding frequency of extruded pellet and moist pellet on growth and body

- composition of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in suboptimal water temperatures. *Fisheries Science* 73, 745–749.
- Lee S.M., Cho S.H. & Kim D.J. (2000) Effects of feeding frequency and dietary energy level on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research* 31, 917–921.
- Lee S.M., Hwang U.G. & Cho S.H. (2000) Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 187, 399–409.
- Mihelakakis A., Yoshimatsu T. & Tsolkas C. (2001) Effect of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition in young common pandora. *Aquaculture International* 9, 197–204.
- MPA-Ministério da Pesca e Aquicultura (2014). Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura-2011. MPA, Brasília 60pp
- Mustac B. & Sinovic G. (2010) Reproduction, length-weight relationship and condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), in the eastern Middle Adriatic Sea (Croatia). *Periodicum Biologorum* 112, 133–138.
- Passini, G., Silva, L.A.R., Carvalho, C.V.A., Sterzelecki, F.C., Cerqueira, V.R. (2013). Resultados preliminares das primeiras desovas da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) em cativeiro. XI Reunião Científica do Instituto de Pesca. 146-148.
- Ratz H.J. & Lloret J. (2003) Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. *Fisheries Research* 60, 369–380.
- Rossi-Wongtschowski C.L.B. (1977) Estudo das variações da relação peso total/comprimento total em função do ciclo reprodutivo e comportamento de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) da costa do Brasil entre 23°S e 28°S. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 26, 31–180.
- Rowland S.J., Allan G.L., Mifsud C., Nixon M., Boyd P. & Glendenning D. (2005) Development of a feeding strategy for silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), based on restricted rations. *Aquaculture Research* 36, 1429–1441.
- Schnaittacher G., King V.W. & Berlinsky D.L. (2005). The effects of feeding frequency on growth of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research* 36, 370–377.
- Tucker B.J., Booth M.A., Allan G.L., Booth D. & Fielder D.S. (2006) Effects of photoperiod and feeding frequency on performance of

- newly weaned Australian snapper *Pagrus auratus*. Aquaculture 258, 514–520.
- Wang Y., Kong L.J., Li K. & Bureau D.P. (2007) Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. Aquaculture 271, 350–356.

CAPÍTULO II

Crescimento, composição centesimal e respostas metabólicas a diferentes taxas de alimentação em juvenis de sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* (Steindachner 1879)

Manecas Francisco Baloi ^{a,b} *, Fábio Carneiro Sterzelecki^b, Juliet Kiyoko Sugai^c, Gabriel Passini^b, Cristina V.A. de Carvalho^b, Vinicius Ronzani Cerqueira^b

^aEscola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras, Universidade Eduardo Mondlane, PO Box 128, Quelimane, Moçambique

^bLaboratório de Piscicultura Marinha, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88061-600, Florianópolis, Brasil

^cDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-90, Florianópolis, Brasil.

*Autor correspondente: M Baloi, Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras, Universidade Eduardo Mondlane, Av.1º de Julho 128, Quelimane, Moçambique.
E-mail: cmbaloi@gmail.com

Resumo

Um experimento de seis semanas foi realizado com o objetivo de determinar a taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira ($1,26 \pm 0,26$ g) com base no crescimento, composição centesimal, parâmetros metabólicos plasmáticos e atividade enzimática. Os peixes foram alimentados com seis taxas de alimentação: 2%, 4%, 6%, 8%, 10% do peso vivo por dia (PV_{dia}^{-1}) e saciedade ($10,3\% PV_{dia}^{-1}$). A sobrevivência dos peixes alimentados de 2 a 6% PV_{dia}^{-1} foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que as outras taxas de alimentação. O peso final e a taxa de crescimento específico aumentaram significativamente com o aumento da taxa de alimentação, enquanto que a utilização de nutrientes diminuiu. O aumento da taxa de alimentação afetou significativamente os níveis de proteínas totais, colesterol e triglicerídeos; no entanto, não houve nenhum efeito significativo ($P > 0,05$) sobre os níveis de glicose. Os teores de proteína corporal e cinzas não foram afetados pelas taxas de alimentação. O teor de lipídios aumentou significativamente com o aumento taxa da alimentação, enquanto que a umidade mostrou uma tendência oposta. As atividades enzimáticas das proteases e da amilase, foram significativamente afetadas pela taxa de alimentação, porém não houve influência sobre a atividade da lipase. Os resultados sugerem que baixas taxas de alimentação estimulam a mobilização dos metabólitos plasmáticos afim de fornecer energia para a manutenção do metabolismo, sendo que as atividades das enzimas digestivas aumentam de modo a melhorar a utilização dos nutrientes. A taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira baseada na taxa de retenção protéica determinada pela regressão polinomial de segunda ordem é de $5,45\% PV_{dia}^{-1}$.

Palavras-chave: Sardinha-verdadeira, composição centesimal, enzimas digestivas, nutrição de peixes, estratégia alimentar, metabólitos plasmáticos

Abstract

A 6-week growth trial was conducted to evaluate the determine the optimal feeding rate for juvenile Brazilian sardine (1.26 ± 0.26 g) based on growth performance, body composition, plasma metabolites and digestive enzymes activities. Fish were fed at six feeding rates, 2%, 4%,

6%, 8%, 10% body weight per day (BWday^{-1}) and satiation ($10.3\% \text{BWday}^{-1}$). The survival of fish fed at 2 to 6 $\% \text{BWday}^{-1}$ was significantly higher ($P < 0.05$) than at the other feeding rates. The final body weight and specific growth rate significantly increased ($P < 0.05$) with increasing feeding rates while, feed utilization decreased. The increased feeding rates significantly affected total proteins, cholesterol and triglycerides; however, there was no significant effect ($P > 0.05$) on glucose levels. Body protein and ash contents were not affected by the feeding rates. Whole-body lipid content increased significantly as the feeding rate increased, while moisture content showed an opposite trend. Proteases and amylase activities were significantly affected by feeding rate, while, the lipase activity was not influenced by the feeding rate. Our results suggest that low feeding rates stimulate mobilization of metabolites to supply energy for the maintenance of overall metabolism and digestive enzymes activities increase to enhance feed utilization. The optimum feeding rate of juvenile Brazilian sardine based on PRR as determined by the second order polynomial regression is $5.45\% \text{BWday}^{-1}$.

Keywords: Brazilian sardine, body composition, digestive enzymes; fish nutrition, feeding strategy, plasma metabolites

1. Introdução

O crescimento de peixes é influenciado por vários fatores tais como tipo de alimento, taxa e frequência de alimentação, ingestão de alimentos e sua capacidade de digerir e absorver os nutrientes (Xie, Ai, Mai, Xu, & Mai, 2011). Entre eles, a taxa de alimentação é bastante importante visto que a determinação da taxa de alimentação ideal contribui na melhoria da viabilidade econômica e no sucesso comercial da aquicultura através de uma melhor utilização da ração e redução dos custos de alimentação (Ahmed, 2010). Estudos anteriores mostraram que o excesso de alimentação pode levar a proliferação de doenças, deterioração da qualidade de água, redução na absorção de nutrientes e aumento dos custos de produção (Mihelakakis, Tsolkas, & Yoshimatsu, 2002; Ng, Lu, Hashim, & Ali, 2000; Silva, Brandão, & Gomes, 2007) enquanto que a subalimentação pode levar ao crescimento reduzido e uma maior heterogeneidade no tamanho dos peixes (Ahmed, 2007; Cho & Bureau, 2001).

Muitos estudos sobre a taxa de alimentação têm enfatizado o seu papel nas taxas de crescimento, eficiência alimentar e composição centesimal (Abbas & Siddiqui, 2009; Abdelghany, Ayyat, & Ahmad, 2002; Eroldoğan, Kumlu, & Aktaş, 2004; Sun et al., 2016). Poucos estudos têm considerado os potenciais efeitos da taxa de alimentação sobre a atividade das enzimas digestivas e dos metabólitos plasmáticos (Harpaz et al., 2005; Hung, Conte, & Hallen, 1993; Shimeno, Shikata, Hosokawa, Masumoto, & Kheyyali, 1997). Estudos sobre enzimas digestivas em peixes podem ajudar na elucidação de alguns aspectos de sua fisiologia nutritiva e, portanto, auxiliar no desenvolvimento de estratégias nutricionais para procedimentos de alimentação e formulação de rações (Suárez, Hidalgo, García Gallego, Sanz, & Higuera, 1995). A capacidade dos peixes para hidrolisar uma dieta em pequenas moléculas, tais como aminoácidos, açúcares simples e ácidos graxos depende da disponibilidade de enzimas digestivas adequadas, as quais medeiam as vias de degradação específicas, de acordo com a natureza física e química do alimento (Phillips, 1969). A medição da atividade específica de enzimas digestivas pode fornecer informação sobre a capacidade digestiva e a eficiência do peixe para utilizar os componentes do alimento. Além disso, a utilização dos nutrientes da dieta pode ser refletida no perfil metabólico em vários tecidos, visto que a eficiência metabólica determina as características de crescimento dos peixes (Debnath, Pal, Sahu, Yengkokpam, Baruah, Choudhury, & Venkateshwarlu, 2007).

A sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, juntamente com outras espécies do gênero *Sardinella*, são responsáveis por cinco por cento da produção mundial de peixes marinhos, porém representam uma proporção muito maior do valor total das capturas (FAO, 2016). A sardinha-verdadeira além de ter uma grande importância ecológica, é um dos recursos pesqueiros mais importantes comercialmente capturados ao longo da plataforma Sul e Sudeste do Brasil (Dallagnolo, Schwingel, & Perez, 2010). Atualmente, é capturada por várias frotas onde é usada como matéria prima na indústria de enlatamento e como isca-viva na pesca do bonito-listrado (*Katsuwonus pelamis*) e sua disponibilidade varia sazonalmente (Santos & Rodrigues-Ribeiro, 2000). As capturas comerciais começaram no final dos anos 50, e tiveram um rápido crescimento na década de 60, atingindo um pico de 228 000 toneladas em 1973 (Cergole, Saccardo, & Rossi-Wongtschowski, 2002). No entanto, em 2011, a produção foi de apenas 75 223 toneladas (MPA, 2014). Considerando a sua importância econômica, um dos esforços que poderiam evitar o colapso da sardinha-

verdadeira, é a sua produção em cativeiro (Cergole & Dias-Neto, 2011). É sabido que a aquicultura pode reduzir a pressão sobre os estoques de peixes selvagens. Além disso, a disponibilidade de isca-viva adequada para a pesca do bonito-listrado, *Katsuwonus pelamis*, representa atualmente um dos principais gargalos para a indústria brasileira de atum. Portanto, esforços para o cultivo de peixes que possam ser usados como isca-viva estão recebendo mais atenção (Collette & Nauen, 1983). Recentemente, Baloi, Carvalho, Sterzelecki, Passini, e Cerqueira (2016) reproduziram com sucesso sardinhas selvagens em cativeiro e conseguiram o cultivo de alevinos e juvenis. No entanto, para avaliar e desenvolver as condições ideais para a produção de novas espécies aquícolas, entre outros requisitos, é necessário estabelecer um protocolo de alimentação adequado. A determinação deste protocolo é importante para proporcionar boa saúde, ótimo crescimento, ótimo rendimento aos peixes, e mínimo desperdício de alimentos. Uma forma de alcançar esse objetivo é a determinação da taxa e frequência de alimentação dos peixes. Em nosso estudo anterior (Baloi et al., 2016), determinamos a frequência de alimentação ótima para juvenis de sardinha-verdadeira alimentados até a saciedade aparente. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo determinar a taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira com base no crescimento, composição centesimal, parâmetros metabólicos plasmáticos e atividade enzimática.

2. Materiais e Métodos

2.1. Procedimentos experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, de 27 de janeiro a 12 de março de 2015 (duração de 43 dias). Juvenis de sardinha-verdadeira foram obtidos através de indução hormonal de reprodutores selvagens mantidos em cativeiro, usando a metodologia descrita por Baloi et al. (2016). Todos os procedimentos de manuseio dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC, PP00861/CEUA/PROPESQ/2013).

Juvenis de sardinha-verdadeira ($n = 2520$, peso inicial: $1,69 \pm 0,26$ g) foram distribuídas em 18 tanques circulares (volume útil de 400 L) localizados numa estufa e mantidos em sistema de recirculação, a uma densidade de estocagem de 140 peixes por tanque e aclimatados

por uma semana. A água de cultivo em cada tanque foi constantemente aerada e o experimento foi conduzido em condições de temperatura e fotoperíodo naturais (14L: 10E). A média da temperatura da água foi de $29,4 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $5,95 \pm 0,72 \text{ mgL}^{-1}$, pH $7,70 \pm 0,17$, salinidade $35,2 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$, alcalinidade $126 \pm 28,12 \text{ mgL}^{-1}$ de CaCO_3 , amônia total e nitrito abaixo de $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ e nitrato $2,11 \pm 0,21 \text{ mgL}^{-1}$.

Seis taxas de alimentação 2%, 4%, 6%, 8%, 10 % peso vivo por dia (PVdia^{-1}) e saciedade aparente foram aleatoriamente testadas em triplicata. Os peixes foram alimentados manualmente três vezes por dia em porções iguais (09:00, 13:00 e 17:00 h) com uma ração comercial (Aquaxcel® extrusada de 0,8-1,6 mm, Cargill Animal Nutrition, Franklinton, LA) durante seis semanas e diariamente a quantidade de ração fornecida era anotada. Quando havia sobra da ração, esta era retirada 30 min após o final do período de alimentação, seca, e pesada para posterior desconto na determinação da quantidade do alimento ingerido. A saciedade foi determinada no ponto de cessação de atividade alimentar voluntária pelos peixes. A composição centesimal da ração era: matéria seca 92,77%, proteína bruta 44,27%, lipídios 25,10% e energia bruta $19,58 \text{ Kj.g}^{-1}$ (AOAC, 1995). Os peixes foram observados diariamente e a mortalidade foi registrada.

A cada 15 dias, 30% dos peixes de cada tanque foram anestesiados (benzocaina, 35 mgL^{-1}) para a realização da biometria que consistia na pesagem para o ajuste da quantidade de ração, exceto para os peixes alimentados até a saciedade. No final do experimento, os peixes de cada tanque foram mantidos em jejum durante 24 h, anestesiados (benzocaina, 35 mgL^{-1}) e posteriormente foram contados e pesados individualmente para o cálculo dos parâmetros de crescimento.

2.2. Composição centesimal

Uma amostra de 30 peixes do tanque matriz, no início do experimento e de cada tanque experimental no final do ensaio foi capturada aleatoriamente, sacrificados com uma overdose de benzocaina (100 mgL^{-1}), e mantidos a -20°C para análise da composição centesimal de acordo com o AOAC (1995). Foram determinados o teor de proteína bruta (método de Kjeldahl), lipídios (extrator de Soxhlet), cinzas (incineração a 550°C por 6 h); umidade (secagem em estufa até peso constante a 105°C por 24 h) e energia bruta com auxílio da bomba calorimétrica adiabática (Parr-6200; Moline, IL, EUA).

2.3. Metabólitos plasmáticos

No final do experimento, os peixes foram anestesiados e sacrificados com benzocaína, 100 mgL^{-1} e em seguida, as amostras de sangue (pool de cinco peixes de cada tanque) foram coletadas por punção caudal com o auxílio de uma seringa descartável (1.0 mL) contendo uma gota de anticoagulante de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA). Uma alíquota de sangue foi imediatamente colocada numa tira de reagente para determinar a glicose, usando um glicosímetro digital (OneTouch® Ultra®, Johnson & Johnson Medical, São Paulo, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 2000 g, durante 5 min, para a obtenção do plasma para a determinação dos metabólitos plasmáticos, que foi realizada com o uso de kits específicos (Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil). A leitura das absorbâncias das colorações obtidas foi feita em espectrofotômetro FEMTO 600 (FEMTO Indústria e Comércio de Instrumentos, SP, Brasil), conforme as instruções do fabricante. O método enzimático-colorimétrico foi utilizado para as determinações de colesterol (Ref 76) e triglicerídeos (Ref 87), enquanto que o colorimétrico-biureto foi utilizado para a análise de proteínas totais (Ref 99).

2.4. Atividade enzimática

No final do experimento, seis peixes de cada tanque foram anestesiados (benzocaína, 100 mgL^{-1}), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C para análise da atividade enzimática. Os peixes foram individualmente dissecados sob gelo e todo o trato gastrointestinal foi extraído e pesado. As amostras foram homogeneizadas com água destilada (1:8, p/v), usando o homegeneizador Tissue-Tearor durante 2,5 min com intervalo de 30 segundos sob gelo e centrifugadas a 20817 g (Eppendorf 5804 R) durante 15 min a 4°C . O sobrenadante foi usado para determinar as atividades enzimáticas da protease alcalina, protease ácida, amilase e lipase.

As proteínas solúveis dos extratos enzimáticos foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como padrão.

A atividade da protease alcalina foi medida pela hidrólise da azocaseína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a pH 7,5 seguindo o método descrito por Garcia-Carreño, Navarrete del Toro e Ezquerria (1997). O controle foi interrompido através da adição de 20% de ácido

tricloroacético (TCA, E. Merck, Darmstadt, Alemanha) no sistema de reação antes da adição de substrato. A atividade específica da protease alcalina ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) foi expressa como a diferença na absorbância à 366 nm entre a amostra e o controle em $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína no extrato).

A atividade de protease ácida foi determinada através da hidrólise de hemoglobina bovina (Sigma, St. Louis, EUA) a pH 2.0 pelo método de Anson (1938) com pequenas modificações, conforme descrito por Vega-Orellana, Fracalossi e Sugai (2006). Os produtos da hidrólise ácida, peptídeos solúveis ao TCA, presentes no sistema de incubação foram determinados a 280 nm utilizando tirosina (E. Merck, Darmstadt, Alemanha), como curva padrão. O branco com extrato enzimático, adicionado depois da adição de TCA, foi preparado para corrigir a hidrólise endógena. A unidade de atividade de protease ácida (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um $1 \mu\text{mol}$ de peptídeos solúveis ao TCA-, quantificados como tirosina $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. A atividade específica da protease ácida foi expressa como $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade de amilase foi determinada pela hidrólise do amido (E. Merck, Darmstadt, Alemanha), segundo preconizado por Aguilar-Quaresma e Sugai (2007), adaptando, proporcionalmente, o volume do sistema de reação para 500 μL . Os produtos da hidrólise da atividade da amilase foram quantificados determinando açúcares redutores pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de acordo com Miller (1959), usando maltose (E. Merck, Darmstadt, Alemanha) como padrão e a leitura das absorbâncias à 540 nm. Para quantificar açúcares redutores endógenos nos homogenatos, e na solução de amido (substrato), foram, também, feitos ensaios (brancos) utilizando homogenatos enzimáticos inativados e solução do substrato, respectivamente. A atividade da amilase foi expressa como atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, ou seja, μmol de açúcares redutores $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína no homogenato).

A atividade da lipase foi determinada de acordo com Sæle, Nordgreen, Olsvik e Hamre (2010) através da hidrólise do 4-nitrofenilmiristato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O sistema de incubação foi feito na microplaca com 96 poços e a absorbância lida a cada minuto durante 30 min a 404 nm, utilizando o espectrofotômetro de leitura de microplaca SpectraMax Plus-384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A atividade específica da lipase foi expressa como sendo μmol de 4-nitrofenilmeristato hidrolisado $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5. Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância unifatorial (ANOVA) depois que foi testada a homogeneidade das variâncias usando o teste de Levene. Quando as diferenças foram significativas ($P < 0,05$), foi utilizado o teste de Tukey para a comparação dos valores médios entre os tratamentos. Os dados percentuais foram transformados para arco-seno antes das análises. Os dados dos cálculos dos parâmetros de crescimento e utilização dos alimentos representam o grupo combinado de todos os peixes por tanque. A taxa de alimentação ideal foi determinada com base na taxa de retenção de proteica (TRP), usando a regressão polinomial de segunda ordem.

3. Resultados

3.1. Parâmetros zootécnicos e utilização dos nutrientes

Os parâmetros zootécnicos e de utilização de nutrientes foram significativamente afetados ($P < 0,05$) pelas taxas de alimentação depois de seis semanas. A sobrevivência dos peixes alimentados com as taxas de 2 a 6% PV.dia⁻¹ foi significativamente maior em relação aos outros grupos. O peso final, ganho em peso (GP) e taxa de crescimento específico (TCE) tiveram um aumento linear com o aumento das taxas de alimentação (Tabela 6). A regressão polinomial de segunda ordem, baseada em dados de taxa de retenção protéica (TRP), indicou que a taxa de alimentação ótima para juvenis de sardinha-verdadeira é de 5,45% PVdia⁻¹ (Figura 5).

A ingestão alimentar diária (IAD) e a utilização de nutrientes nos alimentados com diferentes taxas de alimentação estão descritas na Tabela 7. A IAD de peixes alimentados a 10% de PVdia⁻¹ e saciedade foi significativamente maior ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. A eficiência alimentar (EA), taxa de retenção proteica (TRP) e taxa de retenção energética (TER) diminuíram à medida que a taxa de alimentação aumentou de 4% PVdia⁻¹ até a saciedade. A menor ($P < 0,05$) taxa de retenção lipídica (TRL) foi observada em peixes alimentados a 2% PVdia⁻¹, no entanto não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os outros tratamentos.

Tabela 4. Parâmetros zootécnicos de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação

TA ¹	Sobrevivência (%)	Peso Final (g)	GP ² (g)	TCE ³ (% dia ⁻¹)
2	99,76 ± 0,41 ^a	2,97 ± 0,31 ^f	1,28 ± 0,31 ^f	1,36 ± 0,26 ^d
4	99,52 ± 0,82 ^a	5,88 ± 0,16 ^e	4,19 ± 0,16 ^e	3,04 ± 0,06 ^c
6	99,52 ± 0,41 ^a	7,90 ± 0,17 ^d	6,21 ± 0,17 ^d	3,76 ± 0,05 ^b
8	89,52 ± 4,12 ^b	9,14 ± 0,20 ^c	7,45 ± 0,20 ^c	4,12 ± 0,05 ^{ab}
10	92,62 ± 0,41 ^b	10,12 ± 0,08 ^b	8,43 ± 0,08 ^b	4,37 ± 0,02 ^a
Sac*	89,05 ± 2,89 ^b	10,86 ± 0,26 ^a	9,17 ± 0,26 ^a	4,54 ± 0,06 ^a

1. TA: taxa de alimentação (% PVdia⁻¹) *Sac: Saciedade

Peso inicial: 1,69 ± 0,26 g

Sobrevivência = (número final de peixes/ número inicial de peixes) x100

2. Ganho em Peso (GP) = peso final – peso inicial

3. Taxa de Crescimento Específico (TCE) = 100 x [ln (peso final) - ln peso inicial]/dias]

Valores (médias ± DP) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

3.2. Composição centesimal

Não houve diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos nos teores de proteína bruta e de cinzas. O teor de umidade diminuiu significativamente (P < 0,05) com o aumento das taxas de alimentação, enquanto que o teor de lipídios mostrou uma tendência oposta (Tabela 8).

3.3. Metabólitos plasmáticos

A concentração de proteínas totais, colesterol e triglicerídeos no plasma aumentou significativamente (P < 0,05) com o aumento das taxas de alimentação. No entanto, não houve diferença significativa nos níveis de glicose entre as diferentes taxas de alimentação (Tabela 9).

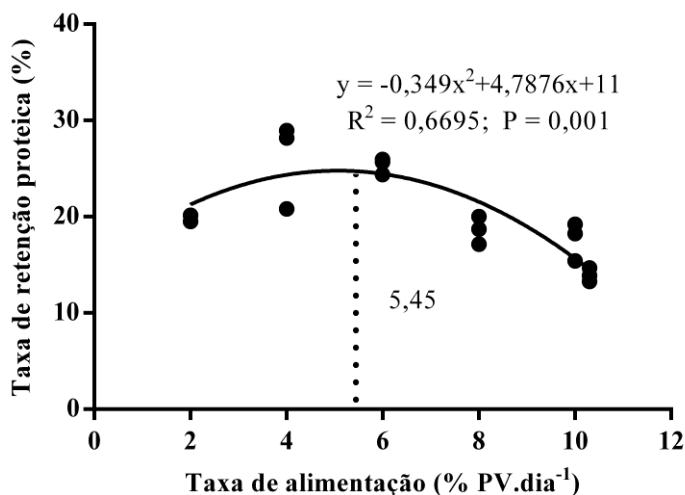


Figura 5. Taxa de alimentação ideal de juvenis de Sardinha-verdadeira baseado na TRP determinada através da regressão polinomial de segunda ordem.

3.4. Atividade enzimática

As atividades específicas da protease ácida, protease alcalina e amilase diminuíram significativamente ($P < 0,05$), com o aumento das taxas de alimentação. Em relação à atividade específica da lipase, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 6).

Tabela 7. Ingestão alimentar diária e utilização de nutrientes em juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação

TA ¹ (% PV/dia ⁻¹)	IAD ² (% PV/dia ⁻¹)	EA ³ (%)	TRP ⁴ (%)	TRE ⁵ (%)	TRL ⁶ (%)
2	2,96 ± 0,03 ^e	74,88 ± 2,11 ^b	18,31 ± 2,67 ^c	10,10 ± 1,80 ^c	-7,55 ± 7,55 ^b
4	4,86 ± 0,08 ^d	84,15 ± 2,36 ^a	25,98 ± 4,49 ^a	27,28 ± 1,74 ^a	61,52 ± 13,20 ^a
6	6,55 ± 0,11 ^c	73,01 ± 2,16 ^b	25,25 ± 0,75 ^{ab}	27,52 ± 1,44 ^a	74,81 ± 4,85 ^a
8	8,43 ± 0,32 ^b	54,21 ± 0,93 ^c	18,63 ± 1,44 ^{bc}	22,69 ± 2,56 ^{ab}	65,88 ± 9,85 ^a
10	9,80 ± 0,53 ^a	50,19 ± 2,61 ^{cd}	17,62 ± 1,97 ^c	22,81 ± 2,24 ^{ab}	69,51 ± 2,35 ^a
Saciedade	10,40 ± 0,42 ^a	46,47 ± 2,05 ^d	13,95 ± 0,70 ^c	22,29 ± 2,29 ^b	70,61 ± 4,91 ^a

- 1. TA: Taxa de Alimentação
- 2. Ingestão Alimentar Diária (IAD) = ingestão total de alimento x 100/[(peso inicial + peso final/2) * dias]
- 3. Eficiência alimentar (EA) = 100 x (ganho em peso/ ingestão total de alimento).
- 4. Taxa de Retenção Protéica (TRP) = 100 x [(peso final x proteína corporal final) - (peso inicial x proteína corporal inicial)] / Ingestão total de proteína.
- 5. Taxa de Retenção Energética (TRE) = 100 x [(peso final x energia corporal final) - (peso inicial x energia corporal inicial)] / Ingestão total de energia.
- 6. Taxa de Retenção Lipídica (TRL) = 100 x [(peso final x lipídeo corporal final) - (peso inicial x lipídeo corporal inicial)] / Ingestão total de lipídios

Valores (médias ± DP de três réplicas) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

Tabela 3. Parâmetros de crescimento de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes frequências alimentares até a saciedade aparente durante 50 dias. Média ± desvio padrão de três réplicas

Frequência alimentar	GP ¹ (g)	TCE ² (% d ⁻¹)	EA ³ (%)	FC ⁴	CV ⁵ (%) peso final
F1	3,30 ± 1,32 ^c	1,35 ± 0,41 ^c	55,24 ± 0,97 ^a	0,82 ± 0,08 ^d	20,05 ± 1,15
F2	4,29 ± 1,49 ^{ab}	1,63 ± 0,40 ^{ab}	43,67 ± 3,35 ^b	0,88 ± 0,07 ^{bc}	19,64 ± 0,86
F3	4,39 ± 1,61 ^{ab}	1,64 ± 0,43 ^{ab}	38,42 ± 2,71 ^c	0,87 ± 0,07 ^c	20,96 ± 1,67
F4	4,32 ± 1,50 ^{ab}	1,64 ± 0,40 ^{ab}	35,60 ± 1,34 ^{cd}	0,90 ± 0,08 ^{ab}	19,68 ± 1,50
F5	4,55 ± 1,62 ^a	1,69 ± 0,42 ^a	38,10 ± 1,86 ^{cd}	0,91 ± 0,09 ^a	20,71 ± 2,29
F6	4,08 ± 1,56 ^b	1,56 ± 0,45 ^b	32,97 ± 2,74 ^d	0,89 ± 0,08 ^{bc}	20,95 ± 2,24
Peso inicial: 3,25 ± 0,56g					
1. Ganho em Peso (GP, g) = peso final – peso inicial					
2. Taxa de Crescimento Específico (TCE, %) = [(ln peso final – ln peso inicial) /dias cultivo] x100					
3. Eficiência Alimentar (EA, %) = [ganho em peso /quantidade de ração ingerida] x100					
4. Fator de Condição (FC) = 100 x (peso corporal/comprimento ³)					
5. Coeficiente de Variação do peso (CV, %) = 100 x (desvio padrão/média)					
Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05)					

Tabela 5. Metabólitos plasmáticos de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação

TA ¹	PT ² (g.L ⁻¹)	GL ³ (mmol.L ⁻¹)	CL ⁴ (mmol.L ⁻¹)	TG ⁵ (mmol.L ⁻¹)
2	12,17 ± 3,04 ^c	3,49 ± 0,90	0,96 ± 0,28 ^d	2,31 ± 0,35 ^d
4	18,08 ± 2,86 ^{bc}	3,91 ± 0,64	1,74 ± 0,33 ^{cd}	3,07 ± 0,65 ^d
6	20,39 ± 3,95 ^b	4,78 ± 0,50	2,32 ± 0,39 ^{bc}	5,01 ± 0,52 ^c
8	20,33 ± 4,14 ^{bc}	5,13 ± 1,27	2,87 ± 0,49 ^b	5,64 ± 0,58 ^{cb}
10	22,58 ± 4,07 ^b	4,95 ± 1,87	2,93 ± 0,33 ^b	6,40 ± 0,48 ^{ab}
Sac [*]	29,40 ± 2,56 ^a	5,07 ± 1,25	3,68 ± 0,29 ^a	6,62 ± 0,51 ^a

1.TA: taxa de alimentação (% PV.dia⁻¹) *Sac: Saciedade

2. PT: Proteínas Totais; 3. GL: glicose; 4. CL: Colesterol; 5. TG: Triglicerídeos

Valores (média ± DP, n = 3 e cada n é composto por pool de cinco peixes por réplica) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

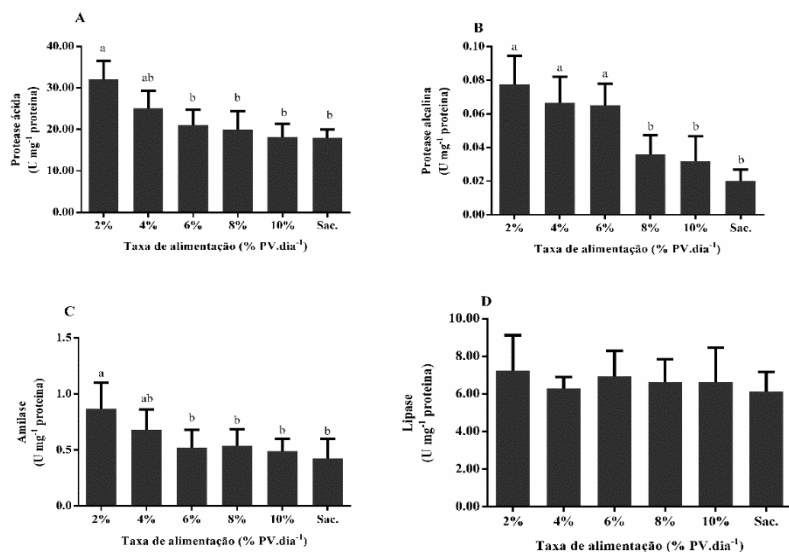


Figura 6. Atividade específicas da protease ácida (A), protease alcalina (B), amilase (C) e lipase (D) de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes taxas de alimentação. Dados são mostrados como média ± DP (n = 6). Barras com letras com diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

4. Discussão

Tanto o GP quanto a TCE aumentaram com a taxa de alimentação até ao nível de saciedade. O aumento da taxa de crescimento de juvenis de sardinha-verdadeira nas taxas de alimentação mais altas por nós obtido está de acordo com os resultados obtidos em juvenis de linguado japonês *Paralichthys olivaceus* (Cho, Lee, Park, & Lee, 2006), pargo *Pagellus bogaraveo* (de Almeida Ozório, Andrade, Freitas Andrade Timóteo, Castanheira da Conceição, & Pinheiro Valente 2009), esturjão branco *Acipenser transmontanus* (de Riu et al., (2012), Luo et al., (2006) e “Korean rockfish” *Sebastes schlegelii* (Mizanur et al., 2014).

A menor sobrevivência obtida em peixes alimentados com mais de 8% PVdia⁻¹ até a saciedade pode ser relacionada com a superalimentação. Uma explicação plausível para isto seria a ruptura estomacal observada em peixes mortos nesses tratamentos. Além disso, estes peixes apresentaram altos níveis de lipídios corporal. Deformidades corporais acompanhadas de elevado conteúdo lipídico corporal foram relatados por Wolnicki, Myszkowski, Korwin-Kossakowski, Kamiński e Stanny (2006) como sendo sintomas de superalimentação em juvenis de *Tinca tinca*. Ademais, altas taxas de crescimento acompanhadas de valores mais baixos de eficiência alimentar são geralmente indicadores de superalimentação (Eroldogan et al., 2004).

A utilização do alimento seguiu um padrão ligeiramente diferente do GP em nosso estudo. A EA, TRP e TRE diminuíram com o aumento das taxas de alimentação. A maior eficiência alimentar (83,74%) foi obtida em peixes alimentados a 4% PVdia⁻¹, enquanto que os peixes alimentados até saciedade apesar do maior crescimento tiveram a menor EA (46,57%). Uma tendência semelhante foi observada nas TRP e TRE, sendo que para ambas as taxas os valores mais altos foram observados em peixes alimentados a 4% PVdia⁻¹. Baixas taxas de alimentação diminuem o crescimento e melhoram a EA, visto que os peixes tendem a otimizar a sua digestão, a fim de utilizar os nutrientes de forma mais eficiente (Meyer-Burgdorff, Osman, & Günther, 1989; Zoccarato et al., 1994). A diminuição das TRP e TRE pode ser explicada por uma exigência de energia mais elevada para a metabolização do alimento em virtude de maior consumo de ração nas taxas de alimentação elevadas, o que é geralmente acompanhado de reduzida absorção de nutrientes (Meyer-Burgdorff et al., 1989). As baixas TRP e TRE observadas nos

peixes alimentados a 2% PVdia⁻¹ indicam que o pouco alimento consumido foi suficiente para suprir a demanda energética de manutenção basal do peixe, às custas da energia para o crescimento somático. Resultados similares foram relatados em juvenis de carpa indiana, *Heteropneustes fossilis* (Ahmed, 2010) e de linguado, *Scophthalmus maximus* (Van Ham et al. 2003).

O ganho em peso não é o único parâmetro que deve ser considerado quando se determina a taxa de alimentação ideal para uma determinada espécie de peixe, uma vez que a eficiência alimentar diminui em taxas de alimentação mais elevadas. De acordo com Bryant e Matty (1981), quando a taxa de alimentação varia, a taxa de crescimento e a eficiência alimentar não são otimizadas na mesma taxa de alimentação. A taxa de alimentação ideal corresponde a um valor intermediário. As taxas de alimentação ideais foram determinadas abaixo do nível de saciedade em juvenis de robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* (Eroldoğan et al., 2004), linguado, *Paralichthys olivaceus* (Kim, Kang, Kim, & Kim, 2007) e “Korean rockfish” *Sebastes schlegeli*, (Mizanur et al., 2014). No nosso estudo, apesar do aumento do ganho em peso com o aumento das taxas de alimentação, a taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira baseada na TRP determinada através da regressão polinomial de segunda ordem, foi de 5,45% PVdia⁻¹.

A composição centesimal é muitas vezes usada como um indicador da qualidade do pescado e é afetada por vários fatores, incluindo a taxa de alimentação (Ahmed, 2007; Khan, Jafri, & Chadha, 2004). O conteúdo de proteínas corporais ou de cinzas parece variar pouco com o crescimento de uma determinada espécie de peixe (Halver & Hardy, 2002). A proteína corporal não foi afetada pela taxa de alimentação no presente estudo, o que sugere que os peixes alimentados com a taxa de manutenção (2% PV.dia⁻¹) ainda podem depositar proteína no corpo, enquanto mobilizam lipídios corporais (National Research Council (NRC), 2011). Não foi encontrada qualquer correlação entre a TRP com a proteína corporal; possivelmente porque a deposição de proteína tenha, em geral, prioridade sobre a deposição de lipídios em juvenis de sardinha-verdadeira. Os menores teores de lipídios e energia corporal observadas em peixes alimentados a 2 % PVdia⁻¹ podem ser correlacionados com baixas TRL e TRE, o que sugere que a energia da dieta fornecida por esta taxa de alimentação foi menor do que a sua exigência energética para a manutenção e os lipídios corporais foram mobilizados para a manutenção dos processos vitais. Em espécies que armazenam lipídios no músculo, como os

Clupeiformes, a mobilização de lipídios intramuscular é iniciada assim que cessa a ingestão de alimentos (Navarro & Gutiérrez, 1995). A relação inversa entre teores de umidade e lipídios encontrados em nosso estudo também foi observada em estudos anteriores sobre a taxa de alimentação (Du et al., 2006; Eroldoğan et al., 2004; Zheng, Deng, De Riu, Moniello, & Hung, 2015). Uma explicação plausível foi proposta por Navarro e Gutiérrez (1995) e McCue (2010), que afirmaram que o excedente de alimento consumido pelos peixes submetidos a altas taxas de alimentação é convertido em reserva de energia e armazenado em tecidos adiposos especializados, substituindo a água, tais como o músculo, o fígado e vísceras, principalmente sob a forma de lipídios. O aumento do teor de energia corporal deveu-se principalmente ao aumento do teor de lipídios com o aumento do peso corporal como foi relatado por Halver e Hardy (2002) e NRC (2011).

Os metabólitos plasmáticos em juvenis de sardinha-verdadeira, foram afetados pelas taxas de alimentação, exceto para a glicose. A mesma tendência foi também observada em juvenis de carpa comum, *Cyprinus carpio* por Shimeno et al. (1997). Por outro lado, Hung et al. (1993) e Cho et al. (2006) estudando alevinos de “striped bass”, *Morone saxatilis* e juvenis de linguado asiático *Paralichthys olivaceus*, respectivamente, relataram que os metabólitos do plasma não foram influenciados pelas taxas de alimentação. Como revisto por Navarro e Gutiérrez (1995), em peixes, a restrição alimentar reduz o armazenamento de energia, reorientando-a para a manutenção da homeostase metabólica. Estes problemas dão origem a uma grande variedade de respostas fisiológicas como; uma redução na taxa de crescimento, alterações no peso de diferentes órgãos e tecido adiposo, bem como no aumento da mobilização dos metabólitos/nutrientes. Uma redução significativa na concentração de proteínas totais foi observada em peixes alimentados com as taxas de alimentação mais baixas, em decorrência da menor ingestão de ração, o que levou ao catabolismo protéico para a produção de energia, a ser utilizada no metabolismo, para manter as funções corporais.

A diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol em taxas de alimentação mais baixas pode ser causada pelo aumento das taxas de mobilização de lipídios (McCue, 2010). Os triglicerídeos são a reserva lipídica mais disponível durante as fases iniciais de privação alimentar (Navarro & Gutiérrez 1995). Pérez-Jiménez, Cardenete, Hidalgo, García-Alcázar, Abellán, e Morales (2007) demonstraram que o jejum pode diminuir os níveis de triglicéridos e colesterol no plasma durante períodos de privação de alimentos. A relação positiva da taxa de

alimentação com as concentrações de colesterol plasmático foi encontrada no robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* por Lemaire, Draï, Mathieu, Lemaire, Carrière, Giudicelli, e Lafaurie, (1991) em condições laboratoriais e por Kavadias, Castritsi-Carharios, e Dessypris, (2003) em habitat natural.

A inalteração nos níveis de glicose, apesar do estado nutricional dos peixes alimentados a 2% de PVdia⁻¹ ser relativamente baixo em relação aos demais tratamentos, pode ser atribuída à importância de manter a homeostase. A glicose é a principal fonte de energia metabólica que circula em teleósteos e é o principal combustível para o cérebro (Soengas & Aldegunde, 2002). A concentração de glicose no sangue permaneceu estável durante a privação alimentar (2% PV.dia⁻¹). Esta aparente defesa da glicose no sangue, em resposta a flutuações ou esgotamento de alimentos, ocorre possivelmente em grande parte às custas do glicogênio hepático (Navarro & Gutiérrez 1995). Nos peixes, a restrição alimentar leva a profundas alterações no metabolismo energético do cérebro aumentando a gliconeogênese, que utiliza substratos metabólicos, tais como glicerol, liberado a partir da mobilização e degradação de triglicerídeos, e de aminoácidos, liberados a partir do catabolismo protéico, principalmente alanina e glutamina (Soengas & Aldegunde, 2002; McCue, 2010).

O crescimento dos peixes é resultado da utilização dos alimentos, que é dependente da sua digestão e absorção, e estes processos são regulados pela atividade das enzimas digestivas (Hakim, Uni, Hulata, & Harpaz, 2006). As proteases, lipases e amilases são importantes enzimas digestivas, que estão envolvidas na digestão da proteína, lipídios e carboidratos, respectivamente (Suzer, Çoban, Kamaci, Saka, Firat, Otgucuoglu, & Küçüksari, 2008). No entanto, estudos correlacionando a atividade de enzimas digestivas e a taxa de alimentação são escassos.

Nossos resultados mostraram que as atividades das proteases e da amilase foram grandemente influenciadas pela taxa de alimentação. As atividades destas enzimas foram maiores no tratamento 2 % PVdia⁻¹, em comparação com os demais tratamentos (Figura 8). Resultados semelhantes foram relatados por Harpaz et al. (2005) em juvenis de robalo asiático, *Lates calcarifer*, que assumiram que a contradição entre a elevada atividade enzimática e o baixo crescimento observado na taxa de alimentação mais baixa poderia ser explicada pela falta de alimentos. Os peixes podem adaptar as suas funções metabólicas para os substratos alimentares, através de uma regulação da secreção de enzimas, de forma a melhorar a utilização dos ingredientes de rações (Caruso, Denaro, & Genovese, 2009). Reimer (1982) também relatou um aumento da

atividade enzimática com a dieta, ou seja, uma dependência do alimento, em juvenis de matrinxã, *Brycon cf. melanopterus*. A presença de atividade lipolítica e a caracterização parcial de lipase em organismos marinhos foram relatadas em poucos estudos (Aryee, Simpson, & Villalonga, 2007).

Em peixes marinhos, a lipase ativada pelos sais biliares (“bile salt-activated lipase”, BAL) é a lipase digestiva mais importante, em relação à lipase pancreática (LP). A BAL possui uma maior especificidade de substrato e pode hidrolisar uma ampla gama de classes de lipídios, enquanto a LP é mais específica para os triglicerídeos (ver revisão de Kurtovic, Marshall, Zhao, & Simpson, 2009). A fisiologia digestiva dos lipídios nas diferentes espécies de sardinha é desconhecida. Não foi encontrada nenhuma relação entre o acúmulo de lipídios em peixes com o aumento da taxa de alimentação e a atividade específica da lipase, provavelmente porque a BAL tem menor especificidade e eficiência digestiva para os triglicerídeos. Em concordância com nossos resultados, Nakagawa, Takeda, Umino, Mustafa, e Yamashita, (1995) relataram que a acumulação de lipídios em juvenis de pargo vermelho, *Pagrus pagrus* alimentados até a saciedade não foi acompanhada de altas atividades lipogênicas.

Em conclusão, quase todos os parâmetros avaliados foram significativamente afetados pela taxa de alimentação. Os nossos resultados sugerem que baixas taxas de alimentação estimulam a mobilização dos metabólitos plasmáticos de modo a fornecer energia para a manutenção do metabolismo e aumento da atividade das enzimas digestivas de modo a melhorar a utilização dos nutrientes. Com base nos resultados obtidos, verificamos que apesar do aumento do ganho em peso com taxas de alimentação mais altas, a taxa de alimentação ideal para juvenis de sardinha-verdadeira baseada na TRP determinada através da regressão polinomial da segunda ordem foi de 5,45% PV.dia⁻¹.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Projeto Isca Viva, número 09/2009). O primeiro autor gostaria de agradecer ao *TWAS-CNPq Postgraduate Fellowship Programme* pela bolsa de doutorado. Ao CNPq pelo apoio ao Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR-UFSC) e bolsas aos demais autores. Um agradecimento

especial ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) pelo suporte técnico durante as análises da atividade enzimática. Agradecimentos também se estendem a toda a equipe LAPMAR pela assistência prestada durante a execução do experimento.

Referências

- Abbas, G. & Siddiqui, P.J.A. (2009) Effects of different feeding level on the growth, feed efficiency and body composition of juvenile mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). *Aquac. Res.*, 40, 781–789.
- Abdelghany, E., Ayyat, M.S. & Ahmad, M.H. (2002) Appropriate timing of supplemental feeding for production of Nile tilapia, silver carp, and common carp in fertilized polyculture ponds. *J. World Aquac. Soc.*, 33, 307–315.
- Aguilar-Quaresma, J. & Sugai, J.K. (2007) Circadian Profile of Feed Consumption and Amylase and Maltase Activities in the Juvenile Shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *J. World Aquac. Soc.*, 36, 141–147.
- Ahmed, I. (2007) Effect of ration size on growth, body composition, and energy and protein maintenance requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Fish Physiol. Biochem.*, 33, 203–212.
- Ahmed, I. (2010). Response to the ration levels on growth, body composition, energy, and protein maintenance requirement of the Indian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch 1974). *Fish Phys. Biochem.*, 36(4), 1133-1143.
- Anson, M.L. (1938) The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain, and Cathepsin With Hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79–89.
- AOAC (1995) Official methods of analysis of AOAC International., 16th ed. Arlington, VA, USA.
- Aryee, A.N.A., Simpson, B.K. & Villalonga, R. (2007) Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 394–402.
- Baloi, M., Carvalho, C.V.A., Sterzelecki, F.C., Passini, G. & Cerqueira, V.R. (2016) Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). *Aquac. Res.*, 47, 554–

560.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Bryant, P.L. & Matty, A. (1981) Adaptation of carp (*Cyprinus carpio*) larvae to artificial diets. 1. Optimum feeding rate and adaptation age for a commercial diet. *Aquaculture*, 23, 275–286.
- Caruso, G., Denaro, M.G., & Genovese, L. (2009). Digestive enzymes in some Teleost species of interest for Mediterranean aquaculture. *Open Fish Sci J*, 2, 74–86.
- Cergole, M.C., Dias-Neto, J. (2011). Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil, Ibama, Brasília, p 180.
- Cergole M.C., Saccardo S.A. & Rossi-Wongtschowski C.L.D.B. (2002) Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977-1997, *Rev. Bras. Oceanogr.* 50, 13–26.
- Cho, C.Y. & Bureau, D.P. (2001) A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquac. Res.*, 32, 349–360.
- Cho, S.H., Lee, S.M., Park, B.H. & Lee, S.M. (2006) Effect of feeding ratio on growth and body composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed extruded pellets during the summer season. *Aquaculture*, 251, 78–84.
- Collete, B.B., Nauen, C.E. (1983). FAO Species Catalogue. Vol. 2 Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. Rome: FAO. FAO Fish Synop. 125 (2):137 p.
- Dallagnolo, R., Schwingel, P.R. & Perez, J.A.A. (2010) Estimativas de produção anual de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) em Santa Catarina: um modelo de projeção de capturas a partir dos padrões mensais de desembarque no Estado. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.*, 14, 95–104.
- De Almeida Ozório, R.O., Andrade, C., Freitas Andrade Timóteo, V.M., Castanheira da Conceição, L.E. & Pinheiro Valente, L.M. (2009) Effects of feeding levels on growth response, body composition, and energy expenditure in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, juveniles. *J. World Aquac. Soc.*, 40, 95–103.
- Debnath, D., Pal, A. K., Sahu, N. P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., & Venkateshwarlu, G. (2007). Digestive enzymes and metabolic profile of Labeo rohita fingerlings fed diets with

- different crude protein levels. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 146, 107-114.
- De Riu, N., Zheng, K.K., Lee, J.W., Lee, S.H., Bai, S.C., Moniello, G. & Hung, S.S.O. (2012) Effects of feeding rates on growth performances of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fries. *Aquac. Nutr.*, 18, 290–296.
- Du, Z.Y., Liu, Y.J., Tian, L.X., He, J., Ge, J.G., Cao, J.M. & Liang, G.Y. (2006) The influence of feeding rate on growth, feed efficiency and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquac. Int.*, 14, 247–257.
- Eroldoğan, O.T., Kumlu, M. & Aktaş, M. (2004) Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. *Aquaculture*, 231, 501–515.
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- Garcia- Carreño, F.L., Navarrete del Toro, A. & Ezquerro, M. (1997). Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Mar. Biotechnol.*, 5, 36–40.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation. In: Hochachka, Mommsen (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. 4, pp. 393–434
- Hakim, Y., Uni, Z., Hulata, G., & Harpaz, S. (2006). Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30% or 48% protein. *Aquaculture*, 257, 420-428.
- Halver, J. E., & Hardy, R. W. (Eds.). (2002). *Fish nutrition* (3rd ed.). Academic press. San Diego, California, USA.
- Harpaz, S., Hakim, Y., Barki, A., Karplus, I., Slosman, T., & Eroldogan, O.T. (2005). Effects of different feeding levels during day and/or night on growth and brush-border enzyme activity in juvenile *Lates calcarifer* reared in freshwater re-circulating tanks. *Aquaculture*, 248, 325-335.
- Hung, S.S., Conte, F.S., & Hallen, E.F. (1993). Effects of feeding rates on growth, body composition and nutrient metabolism in striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. *Aquaculture*, 112, 349-361.
- Kavadias, S., Castritsi-Carharios, J. & Dessypris, A. (2003) Annual cycles of growth rate, feeding rate, food conversion, plasma glucose and plasma lipids in a population of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) farmed in floating marine cages. *J. Appl. Ichthyol.*, 19, 29–34.

- Khan, M.A., Jafri, A.K. & Chadha, N.K., (2004) Growth and body composition of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fed compound diet: Winter feeding and rearing to marketable size. J. Appl. Ichthyol., 20, 265–270.
- Kim, K.D., Kang, Y.J., Kim, K.W., Kim, K.M., 2007. Effects of feeding rate on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. World Aquac. Soc. 38, 169–173. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00086.x
- Kurtovic, I., Marshall, S., Zhao, X. & Simpson, B. (2009) Lipases from Mammals and Fishes. Rev. Fish. Sci., 17, 18–40.
- Lemaire, P., Drai, P., Mathieu, A., Lemaire, S., Carrière, S., Giudicelli, J. & Lafaurie, M. (1991) Changes with different diets plasma Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 93, 63–75.
- Luo, Z., Liu, Y.-J., Mai, K.-S., Tian, L.-X., Tan, X.-Y. & Shi, J.-F. (2006) Effects of Feeding Levels on Growth Performance, Feed Utilization, Body Composition, and Apparent Digestibility Coefficients of Nutrients for Grouper *Epinephelus coioides* Juveniles. J. World Aquac. Soc., 37, 32–40.
- McCue, M.D.(2010) Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol., 156, 1–18.
- Meyer-Burgdorff, K.H., Osman, M.F. & Günther, K.D. (1989) Energy metabolism in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 79, 283–291.
- Mihelakakis, A., Tsoikas, C. & Yoshimatsu, T. (2002) Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. J. World Aquac. Soc., 33, 169–175.
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem., 31, 426–428.
- Mizanur, R., Yun, H., Moniruzzaman, M., Ferreira, F., Kim, K. & Bai, S.C. (2014) Effects of Feeding Rate and Water Temperature on Growth and Body Composition of Juvenile Korean Rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf 1880). Asian - Australas. J. Anim. Sci., 27, 690–699.
- MPA-Ministério da Pesca e Aquicultura (2014). Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura-2011. MPA, Brasília, 60pp
- Nakagawa, H., Takeda, T., Umino, T., Mustafa, M. G., & Yamashita, H. (1995). Effects of feeding regime on biometric parameters and hepatic enzyme activities of young red sea bream, *Pagrus major*. J. Fac. App. Biol. Sci. 34, 167-178.

- Ng, W.K., Lu, K.S., Hashim, R. & Ali, A. (2000) Effects of feeding rate on growth, feed utilization and body composition of a tropical bagrid catfish. *Aquac. Int.*, 8, 19–29.
- National Research Council (NRC) (2011). “Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington, DC.
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M. C., García-Alcázar, A., Abellán, E., & Morales, A. E. (2012). Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Phys Biochem.* 38, 1145–1157.
- Phillips AM Jr. (1969) Nutrition, digestion and energy utilization. In: Hoar WS, Randall DJ, Ed. *Fish Physiology*. Academic Press: London 1969; pp. 391–432.
- Reimer G. (1982) The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrinchã, *Bricon* cf. *melanopterus*. *J Fish Biol.* 21, 637–42
- Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A. & Hamre, K. (2010) Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, 157, 252–259.
- Santos, R.C. dos & Rodrigues-Ribeiro, M. (2000) Demanda De Iscas Vivas Para a Frota Atuneira Catarinense Na Safra De 1998/99: Cpu e , Composição E Distribuição Das Capturas. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.*, 4, 97–101.
- Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T. & Kheyyali, D. (1997) Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 151, 371–377.
- Silva, C.R., Brandão, F.R. & Gomes, L.C. (2007) Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. *Aquaculture*, 264, 135–139.
- Soengas, J.L. & Aldegunde, M. (2002) Energy metabolism of fish brain. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, 131, 271–296.
- Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García Gallego, M., Sanz, A. & Higuera, M. (1995) Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.*, 111, 421–428.
- Sun, G., Liu, Y., Qiu, D., Yi, M., Li, X., Li, Y., 2016. Effects of feeding rate and frequency on growth performance, digestion and nutrients balances of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquac. Res.*, 47, 176–188.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö,

- Küçüksarı, H. (2008) *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280 (1), 140–145.
- Van Ham, E.H., Berntssen, M.H., Imsland, A.K., Parpoura, A.C., Bonga, S.E.W., & Stefansson, S.O. (2003) The influence of temperature and ration on growth, feed conversion, body composition and nutrient retention of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217, 547–558.
- Vega-Orellana, O.M., Fracalossi, D.M. & Sugai, J.K. (2006) Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture*, 252, 484–493.
- Wolnicki, J., Myszkowski, L., Korwin-Kossakowski, M., Kamiński, R. & Stanny, L.A. (2006) Effects of different diets on juvenile tench, *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquac. Int.*, 14, 89–98.
- Xie, F., Ai, Q., Mai, K., Xu, W. & Mai, H. (2011) The optimal feeding frequency of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson) larvae. *Aquaculture*, 311, 162–167.
- Zheng, K.K., Deng, D.F., De Riu, N., Moniello, G. & Hung, S.S.O. (2015) The effect of feeding rate on the growth performance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) fry. *Aquac. Nutr.*, 21, 489–495.
- Zoccarato, I., Benatti, G., Bianchini, M.L., Boccignone, M., Conti, A., Napolitano, R. & Palmegiano, G.B. (1994) Differences in performance, flesh composition and water output quality in relation to density and feeding levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farming. *Aquac. Res.*, 25, 639–647.

CONCLUSÕES GERAIS

Os juvenis de sardinha-verdadeira ($3,26 \pm 0,56$ g) alcançam um melhor crescimento e eficiência alimentar quando alimentados com uma frequência alimentar de duas vezes por dia.

A taxa de alimentação de $5,45\%$ PV.dia⁻¹ permite a melhor utilização dos nutrientes e consequentemente um melhor desempenho zootécnico de juvenis de sardinha-verdadeira ($1,69 \pm 0,26$ g) em cativeiro.

Os parâmetros metabólicos e as enzimas digestivas foram afetados pela taxa de alimentação em para juvenis da sardinha-verdadeira, exceto para glicose e lipase.

Considerando a sardinha-verdadeira como uma nova espécie aquícola, os resultados obtidos no presente estudo contribuem para a determinação de suas estratégias de manejo alimentar e a otimização dos recursos necessários à sua produção em cativeiro, servindo de subsídio para o estabelecimento de um protocolo alimentar para esta espécie.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AHMED, I. Response to the ration levels on growth, body composition, energy, and protein maintenance requirement of the Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*-Bloch 1974). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1133–1143, 2010. BALLAGH, D. A.; PANKHURST, P. M.; FIELDER, D. S. Photoperiod and feeding interval requirements of juvenile mullet, *Argyrosomus japonicus*. **Aquaculture**, v. 277, n. 1-2, p. 52–57, maio 2008.

BARBOSA, M. C.; NEVES, F. DE F.; CERQUEIRA, V. R. Taxa alimentar no desempenho de juvenis de robalo-peva em tanque-rede. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 369–372, 2011.

BAUM, D. et al. The effect of temperature on growth and early maturation in a wild population of Atlantic salmon parr. **Journal of Fish Biology**, v. 67, p. 1370–1380, 2005.

BISWAS, A.; TAKEUCHI, T. Effects of photoperiod and feeding interval on food intake and growth rate of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Fisheries Science**, v. 69, n. 5, p. 1010–1016, 2003.

BISWAS, G. et al. Effect of feeding frequency on growth, survival and feed utilization in mrigal, *Cirrhinus mrigala*, and rohu, *Labeo rohita*, during nursery rearing. **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 211–218, 2006.

BOOTH, M. A. et al. Effect of feeding regime and fish size on weight gain, feed intake and gastric evacuation in juvenile Australian snapper *Pagrus auratus*. **Aquaculture**, v. 282, n. 1-4, p. 104–110, set. 2008.

BUDDINGTON, R.K., KROGDAHL, A., BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.161, p.67-80, 1997.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 187–191, 2005.

CASTAGNOLLI, N. Fundamentos da nutrição de peixes. São Paulo, Ed. Livroceres, 107 p. 1979. CASTAGNOLLI, N. Nutrição de peixes e o desenvolvimento da aquicultura. In: Palestra I

Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, Unesp Botucatu, SP. Anais... Botucatu: Aquanutri, Cdrom. 2005.

CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. O futuro da pesca e da aquicultura marinha na Brasil: a maricultura. **Cienc. Cult. [online].**, v. 62, n. 3, p. 38–39, 2010.

CERGOLE, M. C. Stock assessment of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis*, of the south-eastern Coast of Brazil, **Scientia Marina**, v. 59(3-4), p.597-610, 1995.

CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. **Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil**. Brasília, Ibama, 180 p 2011.

CERGOLE, M. C.; VALENTINI, H. Growth and mortality estimates of *Sardinella brasiliensis* In the southeastern Brazilian blght. **Boletim do Instituto Oceanográfico de Sao Paulo**, v. 42, n. 1/2, p. 113–127, 1994.

CHAGAS, E.C. et al. Notas Científicas Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p. 833-835, 2005.

CHIU, Y. N.; SUMAGAYSAY, N. S.; SASTRILLO, M. A. S. Effect of feeding frequency and feeding rate on the growth and feed efficiency of milkfish, *Chanos chanos*, Forsskal, juveniles. **Asian Fisheries Science**, v. 1, p. 27–31, 1987.

CHO, C. Y.; BUREAU, D. P. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 349–360, 2001.

CHO, H. S. et al. Effects of Feeding Rate and Feeding Frequency on Survival , Growth , and Body Composition of Ayu Post-Larvae *Plecoglossus altivelis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, n. 1, p. 85–91, 2003.

CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K; A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.68-87, 2010.

DA CUNHA, V.L. et al. Feeding rate and frequency on juvenile pompano growth. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 950–954, 2013.

DAVIES, O. A.; INKO-TARIAH, M. B.; AMACHREE, D. Growth response and survival of *Heterobranchus longifilis* fingerlings fed at different feeding frequencies. **Journal of Biotechnology**, v. 5, n. May, p. 778–780, 2006.

EROLDOĞAN, O. T.; KUMLU, M.; AKTAŞ, M. Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. **Aquaculture**, v. 231, n. 1-4, p. 501–515, 2004.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges**. Roma. p. 243. 2014.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all**. Roma. p. 200. 2016.

FRASCA-SCORVO C.M., CARNEIRO D.J.; MALHEIROS E.B. Efeito do manejo alimentar no desempenho do matrinxã *Brycon amazonicus* em tanques de cultivo. **Acta Amazonica**, v.37, p. 621–628, 2007.

GARCIA, v., REYNALTE-TATAJE, DA, ZANIBONI-FILHO, E. Distribuição de ovos e larvas da sardinha-verdadeira na região costeira do estado de Santa Catarina. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41 n.3, p. 619 – 631, 2015

GASALLA, M. A. **Impactos da pesca industrial no ecossistema da plataforma continental interna do Sudeste do Brasil: a abordagem ecossistêmica e a integração do conhecimento**. 2004. 276 f. (Tese de Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2004.

GIGLIOTTI, E.S.; GHERARDI, D.F.M.; PAES, E.T.; SOUZA, R.B.; KATSURAGAWA, M. Spatial analysis of egg distribution and geographic changes in the spawning habitat of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. **Journal of Fish Biology**, v.77 n.10, p. 2248-2267, 2010.

GOMES OLIVEIRA, L. A. A. et al. Crescimento e produtividade de juvenis de robalo-peva a diferentes temperaturas e taxas de alimentação. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 857–862, 2013.

HARPAZ, S. et al. Effects of different feeding levels during day and/or night on growth and brush-border enzyme activity in juvenile *Lates calcarifer* reared in freshwater re-circulating tanks. **Aquaculture**, v. 248, p.325–335.2005

HUNG, S.S., CONTE, F.S.; HALLEN, E.F. Effects of feeding rates on growth, body composition and nutrient metabolism in striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. **Aquaculture**, v.112, p.349–361.1993

JABLONSKI, S. The Brazilian sardine. Is there any room for modelling? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 2, n. 2, p. 86–93, 2007.

JIAN, C. Y.; CHENG, S. Y.; CHEN, J. C. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*, at different salinity and temperature levels. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 175–185, 2003.

KIM, K. D.; KIM, K. M.; KANG, Y. J. Influences of feeding frequency of extruded pellet and moist pellet on growth and body composition of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in suboptimal water temperatures. **Fisheries Science**, v. 73, n. 4, p. 745–749, 2007.

KOUSOULAKI, K. et al. Effect of feeding intensity and feed composition on nutrient digestibility and production performance of common pandora (*Pagellus erythrinus*) in sea cages. **Aquaculture**, v. 272, n. 1-4, p. 514–527, 2007.

KUBITZA, F.; LOVSHIN, L. L. Formulated diets, feeding strategies, and cannibalism control during intensive culture of juvenile carnivorous fishes. **Reviews in Fisheries Science**, v. 7, n. 1, p. 1–22, 1999.

LEE, S. et al. Effects of feeding rate on growth performance and nutrient partitioning of young-of-the-year white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 400–409, 2015.

LEE, S.-M.; HWANG, U.-G.; CHO, S. H. Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture**, v. 187, n. 3-4, p. 399–409, 2000.

LIANG, J. Y.; CHIEN, Y. H. Effects of feeding frequency and photoperiod on water quality and crop production in a tilapia-water spinach raft aquaponics system. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 693–700, 2013.

LIMA, J.H.M; LIN, C.F.; MENESES, A.A.S. As pescarias brasileiras de bonito-listrado com vara e isca-viva, no sudeste e sul do Brasil, no período de 1980 a 1998. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, Tamandaré, v.8 (1), p. 1–92. 2000.

LIN, C.F. Atuns e Afins: estimativa da quantidade de isca-viva utilizada pela frota atuneira. Brasília (DF): IBAMA, 1992. 80 p. (Coleção Meio Ambiente. Série Estudos – Pesca)

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. 2ed Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, USA, 1989.

LOURES, B. R. R. . et al. Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L .) , associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 877–883, 2001.

LUNDSTEDT, L.M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, n. 3, p. 331-339, 2004.

LUO, L. et al. Effects of feeding rates and feeding frequency on the growth performances of juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser schrenckii* Brandt♀×*A. baeri* Brandt♂. **Aquaculture**, v. 448, p. 229–233, 2015.

LUO, Z. et al. Effects of Feeding Levels on Growth Performance, Feed Utilization, Body Composition, and Apparent Digestibility Coefficients of Nutrients for Grouper *Epinephelus coioides* Juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 1, p. 32–40, 2006.

MARTÍ, L. A **Descarga da Sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) no sul e sudeste do Brasil e suas relações com a temperatura superficial do mar e eventos de El Niño e La Niña**. 2012. 78 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Itajubá Instituto de Recursos Naturais, 2012.

MATSUURA, Y. **Estudo comparativo das fases iniciais do ciclo de vida da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e da sardinha-cascuda *Harengula jaguana* (Pisces: Clupeidae) e nota sobre a dinâmica da população da sardinha-verdadeira na Região Sudeste do Brasil**. 1983. 150 f. (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, 1983.

MATSUURA, Y. Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) spawning in the southeast Brazilian Bight over the period 1976-1993. **Revista Brasileira De Oceanografia**, v. 46, n. 1, p. 33–43, 1998.

MPA-Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura-2011**. MPA, Brasília 60p. 2014

MEURER, F. et al. Nível de Arraçoamento para Alevinos de Lambarido-Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*) **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 1835–1840, 2005.

MIHELAKAKIS, A.; TSOLKAS, C.; YOSHIMATSU, T. Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 2, p. 169–175, 2002.

MIHELAKAKIS, A.; YOSHIMATSU, T.; TSOLKAS, C. Effect of feeding frequency on growth, feed efficiency, and body composition in young common pandora. **Aquaculture International**, v. 9, n. 2, p. 197–204, 2001.

MOHSENI, M. et al. Effects of feeding rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. SUPPL. 1, p. 278–282, 2006.

MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas, Editora ULBRA. 2001, 2000 p.

NG, W. K. et al. Effects of feeding rate on growth, feed utilization and body composition of a tropical bagrid catfish. **Aquaculture International**, v. 8, n. 1, p. 19–29, 2000.

OCCHIALINI, D.S. **Diagnóstico da pesca de isca-viva empregada pela frota atuneira no Sudeste e Sul Do Brasil**. 2013, 171f (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. 2013

OLIVEIRA, F.S.C. **Estimativa de captura do bonito-listrado (*Katsuwonus Pelamis*) na costa sudeste do Brasil usando um modelo estatístico e dados de sensoriamento remoto.** 2006. 119 f (Dissertação Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2006.

PÉRES, A., ZAMBONINO INFANTE, J.L., CAHU, C.L. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.19, p. 145–152, 1998

PUVANENDRAN, V.; BOYCE, D. L.; BROWN, J. A. Food ration requirements of 0+ yellowtail flounder *Limanda ferruginea* (Storer) juveniles. **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 459–475, 2003.

RICHE, M. et al. Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 657–673, 2004.

SACCARDO, S. A.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. Biologia e avaliação do estoque da sardinha *Sardinella brasiliensis*: uma compilação. **Atlântica**, v. 13, n. 1, p. 26–43, 1991.

SALAMA, A. J. Effects of different feeding frequency on the growth, survival and feed conversion ratio of the Asian sea bass *Lates calcarifer* juveniles reared under hypersaline seawater of the Red Sea. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 6, p. 561–567, 2008.

SANTOS, R. C. **A captura de iscas pela frota atuneira de vara e isca: histórico, situação atual e perspectivas.** Monografia (TCC)–Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2005.

SCHMITTOU R.H., JIAN Z; CRAMBER M.C. Principles and practices of 80:20 pond fish farming. American Soybean Association, St. Louis, U.S.A., p. 1-93. 1998.

SCHNAITTACHER, G.; KING, W.; BERLINSKY, D. L. The effects of feeding frequency on growth of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 4, p. 370–377, mar. 2005.

SCHNEIDER, F.; SCHWINGEL, P. R. Estudos Preliminares da Ecologia Trófica da *Sardinella brasiliensis* na Costa Sudeste do Brasil. **Notas Téc. Facimar**, v. 3, p. 67–72, 1999.

SCHWARTZLOSE, R. A. et al. Worldwide large-scale fluctuations of sardine and anchovy populations. **South African Journal of Marine Science**, v. 21, p. 289–347, 1999.

SCHWEIGERT, J. F. **Update COSEWIC status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada, in COSEWIC assessment and update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada.** Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. p. 26. 2002.

SHIMENO, S. et al. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 151, n. 1, p. 371–377, 1997.

SILVA, C. R.; BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 135–139, abr. 2007.

SUÁREZ, M.D. et al. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.111, p.421–428, 1995.

SUMAGAYSAY, N. S.; BORLONGAN, I. G. Growth and Production of Milkfish (*Chanos-Chanos*) in Brackishwater Ponds - Effects of Dietary-Protein and Feeding Levels. **Aquaculture**, v. 132, n. 3-4, p. 273–283, 1995.

SUN, G. et al. Effects of feeding rate and frequency on growth performance, digestion and nutrients balances of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems (RAS). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 176–188, 2016.

SUN, L. et al. Growth and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) relative to ration. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 214–220, 2006.

TESSER, M. B.; SAMPAIO, L. A. Criação de juvenis de peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*) em diferentes taxas de arraçoamento. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1278–1282, 2006.

TURA, P. M.; KATSURAGAWA, M. Distribuição de ovos de *Sardinella brasiliensis* na plataforma continental sudeste, uma revisão bibliográfica. **V Simpósio Brasileiro de Oceanografia**, p. 1–4, 2011.

VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Feeding Behavior of Fish and Its Control. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 131–140, 2006.

WANG, N.; XU, X.; KESTEMONT, P. Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles (*Sander lucioperca*). **Aquaculture**, v. 289, n. 1-2, p. 70–73, 2009.

WANG, Y. et al. Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 350–356, out. 2007.

XIA, J.; LI, X. Effect of temperature on blood parameters of the salamander *Batrachiupeus tibetanus* (Schmidt, 1925) (Amphibia: Hynobiidae). **Russian Journal of Ecology**, v. 41, n. 1, p. 102–106, 2010.

XIE, F. et al. The optimal feeding frequency of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson) larvae. **Aquaculture**, v. 311, n. 1-4, p. 162–167, 2011.

YONEDA, N. T. **Criação em laboratório de larvas da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e estudo dos incrementos diários nos otólitos**. 1987. 92f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, 1987.

ZHENG, K. K. et al. The effect of feeding rate on the growth performance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) fry. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 489–495, 2015.

ZHOU, B. Z. et al. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, and size variation of juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 19, p. 244–249, 2003.

ANEXO I

PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

1. EXTRAÇÃO

Material

- Pinça ponta fina
- Bisturi
- Tesoura para cortar íris

Procedimento

1. Abrir janela no lado esquerdo da sardinha, sobre o gelo.
2. Retirar excesso de gordura visceral por raspagem delicada
3. Retirar todo trato gastrointestinal para análise (Esôfago, estômago, cecos pilóricos, intestino)
4. Pesar o trato gastrointestinal
5. Homogeneizar com Tearor – biospex em tubo Falcon com água destilada (1:8) (w/v).
6. Centrifugar 20817 g /4°C/15min

Analisar todas as enzimas da amostra. Não recongelar amostra. Perda de atividade enzimática substancial.

2. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

Método de Bradford (1976).

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v.72:248, 1976.

-Preparação Reagentes

1. *Bradford pronto para uso (SIGMA)*
2. *BSA estoque (0,5 mg/ml)*

- Preparar solução estoque (0,5mg BSA/mL)
- 0,5 mg em 1 mL H₂O destilada
- Congelar

-Procedimento do ensaio

- 1) Fazer a curva de BSA padrão em triplicata (3,6,9).
- 2) Diluir Extrato Bruto da amostra de sardinha em 1:8.
- 3) Ler até no máximo em 1 hora em 595 nm

Reagente	H ₂ O destilada (μl)	Amostra (μl)	Solução Bradford (μl)
Branco (0)	25	0	250
P3	22	3	250
P6	19	6	250
P9	16	9	250
S1	20	5	250
S2	20	5	250

3. PROTEASE ALCALINA TOTAL

Método da hidrólise de Azocaseína (Garcia-Carreño et al., 1997)

Metodologia

A atividade de protease alcalina total foi determinada pela hidrólise da azocaseína (Sigma, St. Louis, MO, USA) pelo método descrito por Garcia-Carreño et al. (1997) a 25°C. Para a determinação dos produtos desta atividade, o sistema de incubação, após cessada a reação, foi mantido por 15 min a 4°C e centrifugado a 11.000 g por 5 min. A absorbância a 366 nm, deste sobrenadante foi lida em espectrofotômetro (FEMTO, modelo 660). A atividade de protease alcalina total foi expressa em atividade específica, pela diferença na absorbância entre o teste e um controle, por minuto, por mL do sistema de reação, por mg de proteína no extrato enzimático (Atividade específica = $\Delta A_{366\text{nm}} \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína).

GARCIA-CARREÑO, F.L.; NAVARRETE DEL TORO, M.A.; EZQUERRA, J.M. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. Effect of protease inhibition in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology*, v.5, p.36-40. 1997.

Método descrito em:

Mônica Y. Tsuzuki, Juliet K. Sugai, Júlio Cesar Maciel, Claire J. Francisco, Vinícius R. Cerqueira. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, v. 271: 319–325, 2007.

PREPARAÇÃO REAGENTES

1) Tampão Tris/HCl pH 7,5 50 mM

-Preparar solução concentrada 10X (0,5 M) 100 mL. Diluir na hora do uso.

Solução Tris 0,5 M

121,14 g ----- 1000 mL ----- 1 M

60,57 g ----- 10 mL ----- 0,5 M

3,634 g -----60 mL-----0,5 M

Solução HCl 36% (0,5 M)

0,21 mL HCl ---50 mM --- 50 mL H₂O

1,05 mL HCl ---0,5M-----50 ml H₂O

2) Ácido tricloroacético (TCA) ou 20% (w/v)

20 g → 100 ml de H₂O destilada

3) Azocaseína 1% em tampão Tris/HCl (50 mM)

Preparar na hora do uso

0,1g→10 ml de tampão.

-PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1- Preparar solução de Azocaseína em tampão tris/HCl antes de cada ensaio. Misturar por +- 5 minutos até dissolver.

2- Marcar Eppendorf (2 ml), 3 testes e 2 controles para cada amostra.

3- Usar 300 µl do sistema de incubação para placa.

Solução	Teste (µl)	Controle (µl)
Tampão	450	450
Enzima	50	50
TCA 20%	-----	500
Substrato	500	500
Incubar 15 min a temperatura ambiente 25 °C		
TCA 20 %	500	-----
Incubar 10 min 4 °C		
Centrifugar 11.000 g por 5 min		
Ler o sobrenadante à 366 nm		

- Expressão da atividade enzimática: atividade específica (U/mg proteína [do EB])

Unidade de enzima = Δ Absorbância $_{366\text{ nm}}$ /min/mL

Atividade específica = Δ Absorbância $_{366\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína

4. PROTEASE ÁCIDA

Método baseado em Anson, M.L. (*J.Gen.Physiol.*, 22:79, 1938), descrito em *Meth. Enzymol.*, v.II: 3, 1955. Capítulo: Herriot, Roger M. Swine Pepsin and Pepsinogen. p. 3-5

Metodologia:

A atividade de protease ácida foi determinada através da hidrólise de hemoglobina bovina (Sigma, St. Louis, USA) pelo método de Anson (1938) com pequenas modificações, conforme descrito por Vega-Orellana et al. (2006). Os produtos da hidrólise ácida, peptídeos solúveis ao ácido tricloroacético (TCA), presentes no sistema de incubação (25°C) foram determinados pelo reagente Folin-Ciocalteu (FLUKA Biochemika, Switzerland ou Sigma, USA), a 660 nm, através de uma curva padrão de tirosina (Merck S.A., Darmstadt, Germany). A atividade foi expressa como atividade específica: μmol de tirosina, $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína (por mL) do homogenato.

ANSON, M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, v. 22, p.79-85. 1938.

VEGA-ORELLANA, M.O., FRACALOSSO, D.M., SUGAI, J.K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture*, v.252, p.484-493. 2006.

-PREPARAÇÃO REAGENTES

1) Hemoglobina 2% diluída em HCl 0,06N

Preparar na hora do uso.

2 g hemoglobina----100 ml de HCl 0,06 N

2) TCA 5% 3 M

5 g ácido tricloroacético ----100 ml H₂O destilada

Guardar na geladeira

3) Solução HCl 0,06 N

Estoque: 36% (Merck)

1M -----85,9 mL----1000mL

0,06N---5,154 mL----1000mL

0,06N—5,014 mL HCl --- 100 ml

4) NaCl 0,1M

1 M----58,5 g NaCl----1000ml

0,1 M ---5,85 g NaCl---1000ml

0,1 M —0,585 g NaCl—100ml

5) Solução de NaOH 0,5 N

58,5 g -----1 N-----1000mL

29,25 g-----0,5 N-----1000mL

1,4625 g-----0,5 N-----50mL

6) Solução padrão de Tyr 0,5mM diluída em HCl 0,2 M

1 M -----181,19 g de Tyr-----1000 mL
 0,0005 M--- 0,09059 g de tyr-----1000 mL
0,5 mM--- 0,0018 g de tyr -----20 mL

7) Bradford (sigma) Pronto para uso

-PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1). Preparar solução de hemoglobina

2) Protocolo de sistema de reação em Eppendorf de 2 ml

Reagente	Teste (µl)	Controle (µl)
Hemoglobina 2%	250	250
TCA 5%	-----	500
NaCl 0,1 M	500	500
H ₂ O destilada	175	175
EB (até 200ul)	25	25
Incubar 10 min 25°C		
TCA 5%	500ul	-----
Aguardar 5 min no gelo		
Centrifugar 1.110 g/5 min		
Ler o sobrenadante à 280 nm		

3) Determinação dos produtos da atividade das proteases ácidas pelo reagente de Bradford

a). Fazer curva padrão de Tyr.

Tyr 0,5mM (ul)	HCl 0,2M	Tyr (µmol)	DO 595nm
5	145	0,0050	
10	140	0,0125	
25	125	0,0250	
50	100	0,0500	
75	75	0,0750	
100	50	0,1000	
125	25	0,1250	
150	0	0,1500	

b). Para cada amostra/replica no Eppendorf 2 ml

Reagente	Amostra/cont (μ l)	Padrão (100)	Branco
Sobrenadante/padrão	150	150	-----
HCl qsp para 150	150	-----	-----
NaOH 0,5 N	350	350	-----
H ₂ O destilada	-----	-----	500
Bradford	500	500	500
Incubar 5 min e colocar 300 μ l no poço			
Ler em 595nm (em até 1 hora)			

5. AMILASE

Método: hidrólise do amido, baseado no método de Rick, W. e Stegbauer, H.P. 1974 [Alpha-Amylase: Measurement of reducing groups. In: Bergermeyer, H.U. (ed.) Methods of Enzymatic Analysis. Volume 2. 2nd ed., Weinheim: Verlag Chemie, 1974:885-915.] e descrito por Aquilar-Quaresma e Sugai (2005), abaixo.

Os produtos da hidrólise da atividade da amilase foram quantificados pela determinação de açúcares redutores pelo método de reagente 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Sumner, J.B. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitric salysilic acid. J.Biol. Chem., v. LXII (2): , 287-290, 1924), descrito por Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*,v.31(3): 426-428, 1959).

AGUILAR-QUARESMA, J., SUGAI, J.K. Circadian profile of feed consumption and amilase and maltase activities in the juvenile shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. J.World Aquacult. Soc.,v.36, n.1, p.141-147. 2005.

Mônica Y. Tsuzuki, Juliet K. Sugai, Júlio Cesar Maciel, Claire J. Francisco, Vinícius R. Cerqueira. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, v. 271: 319–325, 2007.

PREPARAÇÃO REAGENTES

1) Amido 1 % (MERCK)

0,5g ----- 50 mL ferver solução até ficar translúcida. \pm 20 minutos

2) Tampão citrato/fosfato (Mc. Ilvoine) pH 6,8

3) Solução NaCl 0,1 M

1 M ---- 58,5 g NaCl ----- 1000mL

1 M ---- 5,840 g NaCl ----- 1000mL

1M --- 0,584 g NaCl ----- 100mL

4) Padrão de Maltose (1.H₂O Merck) (5 mg/mL) p/ 2ml

- Preparar 500 μ l padrão com 500 DNS em triplicata.

- Ferver por 5 minutos e ler em 540 nm

5) Reativo Dinitrosalicilato de sódio (DNS- sigma) para 500ml

5 g DNS

8g NaOH (MERCK) ---- 100 ml

150g Tartarato duplo de Na e K ----- 250 ml (aquecer gentilmente)

qsp. para 500ml

-PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1- Descongelar reagentes

2- Ferver o amido até clarear.

3- Esfriar até temperatura ambiente o amido.

4- Sistema de incubação em Eppendorf de 2 ml com tampa furada para fervura a 100 °C.

5- Após reação, transferir 300 μ l do sistema para poço na microplaca.

6- São 3 testes e 2 controles para cada amostra. A cada corrida, fazer 1 branco e 2 padrões 4

Solução	Teste (μ l)	Controle (μ l)	Branco (μ l)	Padrão (μ l)
Tampão	100	100	-----	-----
NaCl	50	50	-----	-----
H ₂ O dest.	90ul	90ul	500	-----
EB	10ul	-----	-----	-----
Amido	250	250	-----	-----
Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente 25°C				
Padrão 4	-----	-----	-----	500
DNS	500	500	500	500
EB	-----	10	-----	
Ferver por 5 minutos				
Ler em 540 nm				

LIPASE

Determinada pela hidrólise do substrato sintético p-dinitrofenilmiristato, segundo descrito por Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A., Hamre, K. Characterization and expression of digestive neutral lipase during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v.157, p.252-259. 2010.

PREPARAÇÃO REAGENTES

1) DMSO (65,8 mM) p/ 10 mL

1000 mM – 78,13 g DMSO – 1000 mL

65,8 mM – 5,14 g DMSO – 1000 mL

65,8 mM – 0,0514 g DMSO – 10 mL (densidade 1,1)

$V = m/d$ 0,0514/1,1 = 0,046 ml

2) P-Nitrofenil Meristato 0,8 mM (final 0,4 mM) (in 10 ml) (Sigma Aldrich 70124-1G)

1000mM – 349,46g PNP – 1000ml

0,8 mM – 0,2795 g - 1000 ml

0,8 mM – 0,00279 g – 10ml

3) *Bicarbonato de amônio 50 mM (final 25 mM) (pH 7,8) (p/10 ml)*

1 Mol – 79,06g BA – 1000ml

1000mM- 79,06 g BA – 1000ml

50mM – 3,953g BA- 1000ml

50 mM – 0,03953 g BA – 10 ml

4) *Colato de sódio 0,313 M (Final 0,125 M) (270911-25G Sigma Aldrich) 10 ml*

1M----- 430,55 g CS-----1000ml

0,313 M—134,76g CS----1000ml

0,313 M --- 1,348 g CS-----10ml

5) NaCl 93,7 mM (final 37,5 mM)

1 M --- 58,44 g NaCl -----1000ml

0,0937 M----5,475 g NaCl----1000ml

93,7mM---0,0548 g NaCl----100ml

-PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1). Fazer a solução A: Diluir 0,00279 g de meristato no (DMSO) e qsp com bicarbonato de amônia para 10 ml. Caso o meristato não dilua, aquecer levemente.

2). Fazer a solução B: Misturar 1,348 g de colato de sódio em 10 ml de solução de sódio 93,7 molares (qsp).

3). Para cada amostra pipetar diretamente na microplaca: 3 testes e 2 brancos.

4). Inativar branco (aquecer a 100 °C por 5 min). Centrifugar depois (3 min a 10.000 g)

5) Sistema de incubação na placa de 96 poços:

Reagente	Amostra	Branco (Enz. Inativa)
EB	20	20
H ₂ Odest	-----	-----
Solução B	80	80
Solução A	100	100
Medir a cada 10 segundos/30 minutos		

ANEXO II

Figura 7. Indução hormonal da sardinha-verdadeira



Figura 8. Juvenis de sardinha-verdadeira

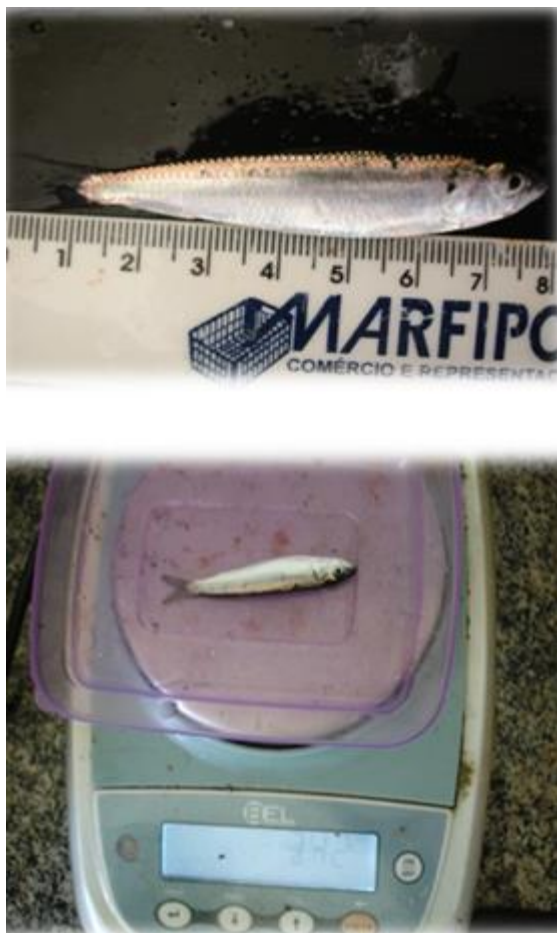


Figura 9. Exemplos de sardinha-verdadeira



Figura 10. Sala experimental com sistema de recirculação



Figura 11. Sala experimental



Figura 12. Sinfonagem dos tanques



Figura 13. Alimentação dos peixes

APÊNDICE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS
RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

INSTRUÇÃO NORMATIVA N 15, DE 21 DE MAIO DE 2009

O PRESIDENTE DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, no uso das atribuições que lhe confere o inciso XVIII do art. 2º, do Anexo I ao Decreto nº 6.099, de 26 de abril de 2007, que aprova a Estrutura Regimental do IBAMA, publicada no Diário Oficial da União de 27 de abril de 2007, e tendo em vista o disposto no Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, na Lei nº 8.617, de 04 de janeiro de 1993 e no Decreto nº 5.583, de 16 de novembro de 2005; e,

Considerando o elevado estado de sobrepesca em que se encontra o estoque de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e a necessidade de sua recuperação visando o retorno da pesca para níveis de sustentabilidade, conforme previsto na proposta em discussão de Plano de Gestão para o Uso Sustentável da espécie;

Considerando que uma das medidas apontadas na proposta de Plano de Gestão é a necessidade de redução do esforço de pesca, em número de embarcações, permissionadas com base na Portaria IBAMA nº 96/97, de 22 de agosto de 1997; Considerando como referência o quantitativo de 210 embarcações obtido por meio de levantamento preliminar da frota permissionada pela Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República - SEAP/PR.

Considerando a necessidade de assegurar que a captura direcionada a sardinha verdadeira, pela frota legalmente permissionadas, incida sobre indivíduos que se reproduziram pelo menos uma vez;

Considerando a necessidade de adequação das durações e dos períodos de defeso para a proteção da reprodução e recrutamento da espécie a partir do defeso de 2009; e,

Considerando, finalmente, as recomendações construídas por consenso na 5ª Reunião do Comitê de Gestão do Uso Sustentável de Sardinha-Verdadeira - CGSS, ocorrida em Brasília/DF, nos dias 15 e 16 de dezembro de 2008 e o que consta do Processo IBAMA/Sede nº 02001.004889/2003-71, resolve:

Art. 1º Manter limitado o esforço de pesca para a captura de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e respectiva fauna acompanhante, pela modalidade de cerco, na área compreendida entre os

paralelos 22°00'S (Cabo de São Tomé, Estado do Rio de Janeiro) e 28°36'S (Cabo de Santa Marta, Estado de Santa Catarina), às embarcações devidamente permissionadas e inscritas no Registro Geral da Pesca - RGP, com base na Portaria IBAMA nº 96/97, de 22 de agosto de 1997.

Parágrafo único O limite de esforço de pesca de que trata o caput poderá ser reavaliado e redefinido a partir dos resultados do recadastramento obrigatório da frota a ser efetivado pelo órgão competente e dos resultados e recomendações técnicas do Grupo Técnico de Trabalho Interinstitucional a ser criado com esta atribuição, e após consulta ao CGSS.

Art. 2º A substituição das embarcações referidas no art. 1º desta Instrução Normativa somente será autorizada pelo órgão competente nos casos de sinistro devidamente comprovado pela autoridade marítima.

Parágrafo único A embarcação a ser permissionada deverá ter características similares às da embarcação substituída e pertencer ao mesmo proprietário.

Art. 3º Periodicamente serão quantificados e redefinidos os parâmetros técnicos e normativos a serem adotados para o limite do esforço de pesca, dentre outros, visando assegurar a sustentabilidade no uso da sardinha-verdadeira.

4º: Proibir, anualmente, a captura da sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), na área compreendida entre os paralelos 22°00' Sul (Cabo de São Tomé, Estado do Rio de Janeiro) e 28°36' Sul (Cabo de Santa Marta, Estado de Santa Catarina), durante os picos de recrutamento e de reprodução da espécie, conforme abaixo discriminados: I de 15 de junho a 31 de julho; e, II de 1º de novembro a 15 de fevereiro.

Parágrafo único O desembarque da referida espécie somente será tolerado, anualmente, até os dias 17 de junho e 3 de novembro, respectivamente, conforme o início dos períodos de defeso estabelecidos nos incisos I e II deste artigo. **(Retificação publicada no DOU nº 100, de 28 de maio de 2009, pág. 130).**

Art. 5º: Durante os períodos de defeso, as pessoas físicas ou jurídicas que atuam no transporte, na estocagem, na comercialização, no beneficiamento e na industrialização de sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), anualmente, deverão fornecer às Superintendências Estaduais do IBAMA, a declaração dos estoques in natura, congelados ou não, existentes, nos dias 17 de junho e 3 de novembro, respectivamente, conforme o início dos períodos de defeso estabelecidos nos incisos I e II do Art. 4º desta Instrução Normativa.

Parágrafo único A declaração do estoque de que trata o caput, deverá ser entregue às Superintendências Estaduais do IBAMA até os dias 22 de junho e 9 de novembro, respectivamente, conforme modelo anexo e acompanhar o produto até seu destino final. **(Retificação publicada no DOU nº 100, de 28de maio de 2009, pág. 130).**

Art. 6º Proibir a captura, o desembarque, o armazenamento, o transporte, a salga e a comercialização da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), de comprimento total inferior a dezessete centímetros, na área compreendida entre os paralelos 22°00'Sul (Cabo de São Tomé, Estado do Rio de Janeiro) e 28°36'Sul (Cabo de Santa Marta Grande, Estado de Santa Catarina). **(Retificação publicada no DOU nº 100, de 28de maio de 2009, pág. 130).**

§ 1º Tolerar-se-á o máximo de dez por cento (10%) de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) com comprimento inferior a dezessete centímetros, em relação à captura total da espécie, em peso, no ato da fiscalização.

§ 2º Para efeito de mensuração, considera-se comprimento total (CT) a medida tomada entre a ponta do focinho e a extremidade da nadadeira caudal.

Art. 7º Aos infratores da presente Instrução Normativa serão aplicadas as penalidades previstas na Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e no Decreto nº 6.514, de 22 de julho de 2008. Art. 8º Esta instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação. **(Retificação publicada no DOU nº 100, de 28de maio de 2009, pág. 130).**

Art. 9º Ficam revogados o art. 2º da Portaria IBAMA Nº 96, de 22 de agosto de 1997, publicada no Diário Oficial da União de 25 de agosto de 1997 e o Art.1º da Portaria IBAMA Nº 68/03, de 30 de outubro de 2003, publicada no Diário Oficial da União de 31 de outubro de 2003 e a Instrução Normativa IBAMA Nº 128, de 26 de outubro de 2006, publicada no Diário Oficial da União de 27 de outubro de 2006.